Aus der Medizinischen Klinik der Philipps-Universität
Marburg/Lahn
(Direktor: Professor Dr. G.A. Martini)

DIE BESTIMMUNG ZELLULÄRER IMMUNREAKTIONEN GEGEN HBs-ANTIGEN BEI PATIENTEN MIT VIRUSHEPATITIS B MIT DEM MIGRATIONSINHIBITIONSTEST

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

MAGDALENA PENCEV
aus Prag

Marburg 1978

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus der Medizinischen Klinik der Philipps-Universität
Marburg/Lahn
(Direktor: Professor Dr. G.A. Martini)

DIE BESTIMMUNG ZELLULÄRER IMMUNREAKTIONEN GEGEN HBs-ANTIGEN BEI PATIENTEN MIT VIRUSHEPATITIS B MIT DEM MIGRATIONSINHIBITIONSTEST

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

MAGDALENA PENCEV
aus Prag

Marburg 1978

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg am 27. Januar 1978

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. med. F. Neurath
Referent: Prof. Dr. med. C.-P. Sodomann
Correferent: Prof. Dr. med. H. Kaffarnik

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1 Geschichtliche Entwicklung der Theorien über die Pathogenese der Hepatitis
1.2 Entdeckung des Australia-Antigens, seine Morphologie und biochemischen Eigenschaften, Nachweismethoden
1.3 Zelluläre und humorale Immunphänomene bei akuter und chronischer Virushepatitis
1.4 Experimentelle Untersuchungen der zellulären Immunreaktionen in vitro
1.5 Bisherige Ergebnisse der Untersuchungen über den MIF bei verschiedenen Lebererkrankungen
1.6 Aufgabenstellung

2. Material und Methoden

2.1 Die untersuchten Patientengruppen und die Kontrollgruppe
2.2 Verwendete Methoden
2.3 Verwendete Substanzen und Chemikalien
2.4 Die Vorversuche
2.4.1 Der einzeitige MIF-Test
2.4.2 Herstellung der Agarose
2.4.3 Gewinnung von Leukocyten
2.4.4 Berechnung und Auswertung der Migration
2.4.5 Der zweizeitige MIF-Test
2.4.6 Die Lymphocytenkulturen
2.5 Die Hauptversuche

3. Ergebnisse

3.1 Der zweizeitige MIF-Test in den Vorversuchen
3.2 Der einzeitige MIF-Test in den Vorversuchen

3.3 Die Einwirkung von HBs-Ag auf die Migration der Leukocyten der verschiedenen untersuchten Patientengruppen

4. Diskussion

4.1 Diskussion der Theorien der Pathogenese der akuten und chronischen Virushepatitis
4.2 Untersuchungsplan
4.3 Verwandte Methoden
4.4 Besprechung der Ergebnisse

5. Zusammenfassung

6. Literaturverzeichnis

Anerkennung und Verzeichnis der akademischen Lehrer
Lebenslauf
Erklärung

1. Einleitung

1.1 Geschichtliche Entwicklung der Theorie über die Pathogenese der Hepatitis

Die Gelbsucht war als ansteckende Erkrankung schon im Altertum bekannt. Als erstes berichtet 377 v. Chr. Hippokrates, später im 8. Jahrhundert Papst Zacharias in einem Schreiben an den Heiligen Bonifatius über große Gelbsuchtsepidemien bei Jugendlichen. Die Mitteilungen über weitere Epidemien, die vor allem während der Kriege unter den Soldaten ausbrachen, häuften sich seit der Mitte des letzten Jahrhunderts.

Der Verdacht einer parenteralen Übertragung wurde 1882 von Zürmann ausgesprochen, der eine Häufung von Gelbsucht nach einer Pockenschutzimpfung bei Hafenarbeitern beschrieb. Dasselbe wurde auch später nach der Einführung von Insulin 192o und nach Transfusionen beobachtet.

1865 bezeichnete Virchow den hepatogenen Ikterus als katarrhalischen Ikterus, da er der Meinung war, daß ein Schleimtropf den Gallengang verstopfte und ein Darmkatarrh sich auf die Gallenwege ausbreitete (93).

Diese Vorstellung hielt sich bis in die dreißiger Jahre unseres Jahrhunderts, wo zum ersten Mal auf die morphologischen Veränderungen im Sinne von Rundzellinfiltrationen des periportalen Feldes und von Einzelzellnekrosen des Leberparenchyms hingewiesen wird (6, 58, 28).

Wertvolle Informationen über Epidemiologie, Prognose und einige Charakteristika des infektiösen Agens der Gelbsucht brachten Arbeiten in den frühen

vierziger Jahren (33, 34, 59).

Die Entwicklung der Leberpunktion durch Roholm und Iversen Ende der dreißiger Jahre, ihre Verbesserung zu einer gefahrlos anzuwendenden Methode durch Menghini und die Einführung der Laparoskopie ermöglichten genaue Beschreibung der morphologischen Veränderungen und Abgrenzung der einzelnen Verlaufsformen.

Durch weitere klinische Arbeiten (44, 45) konnten diese Vorstellungen ausgebaut und experimentell bestätigt werden: So sind nach epidemiologischen und klinischen Gesichtspunkten zwei Formen der Virushepatitis definiert worden: Die Virushepatitis A (MS - 1 - Virus), die durch eine kurze Inkubationszeit (15 - 5o Tage) und eine vorwiegend orale Übertragung charakterisiert ist, und die Virushepatitis B (MS - 2 - Virus) mit langer Inkubationszeit (5o - 24o Tage) und vorwiegend parenteraler Übertragung durch Blut, Blutprodukte und übrige Körperflüssigkeiten.

1.2 Entdeckung des Australia-Antigens, seine Morphologie und biochemischen Eigenschaften, Nachweismethoden

Neue Erkenntnisse über die Pathogenese der Hepatitis brachte schließlich 1964 die Entdeckung des Australia-Antigens durch Blumberg und seine Mitarbeiter (11). Auf der Suche nach neuen Allotypen des β_1-Lipoproteins fanden sie bei der Reaktion von 24 Seren australischer Ureinwohner mit Seren von zwei polytransfundierten Haemophilen in einem Falle eine Präzipitation. Das Antigen beinhaltete zwar Lipoproteine, unterschied sich aber stark von der Konformation des β_1-Lipo-

proteins. Da das Serum mit dem neuen Antigen von einem australischen Ureinwohner stammte, wurde zunächst der Name Australia-Antigen für das neue Antigen verwandt.
Spätere Untersuchungen (1965 - 1968) zeigten Häufungen des Antigens bei Patienten mit Leukämie (18 %), Hepatitis (2o %), Down-Syndrom (28 %) etc. (8).

1968 wiesen etwa zur gleichen Zeit Prince und Okochi und Murakami ein Antigen im Prodromalstadium der Serumhepatitis nach und stellten fest, daß dieses mit dem Australia-Antigen identisch war (61, 66). Wegen der Assoziation mit der Hepatitis B erhielt das Antigen später den Namen Hepatitis-B-Antigen = HB - Ag .

Zum Nachweis von HB-Ag stand anfangs die relativ unempfindliche Agargel-Doppeldiffusionsmethode nach Ouchterlony zur Verfügung. Später kamen die Überwanderungselektrophorese (Pesendorfer), die Komplementbindungsreaktion, die passive Haemagglutination, der Radioimmunoassay und letztlich der Nachweis mit enzymmarkierten Antikörpern als sehr sensible und spezifische Methode dazu, so daß das HB-Ag bei etwa 45 - 5o % der Hepatitiskranken nachzuweisen war (7, 12, 64, 91, 94), was dem Anteil der Virushepatitis B entsprach.

Entsprechend den Ergebnissen der HB-Ag-Untersuchung und der früheren epidemiologischen Kenntnisse über die Hepatitis bezeichnete man die sog. infektiöse, durch eine kurze Inkubation gekennzeichnete und HB-Ag-negative Hepatitis als die A-Form. Früher veröffentlichte Berichte über den Nachweis eines Antigens im Serum, das entsprechend mit der Virus-

hepatitis A assoziiert sei, konnten nicht bestätigt werden (54). Andererseits ist der Erregernachweis im Stuhl bei der Hepatitis A mit Rekonvaleszentenserum gelungen (21, 26, 37, 38, 5o).

Die Virushepatitis B hat eine lange Inkubationszeit und ist HB-Ag-positiv. Letztlich wurde eine Hepatitis C als infektiöse Hepatitis postuliert, für die weder die Charakteristika der Virushepatitis A noch die Virushepatitis B gefunden werden konnte (92). Sie ist durch eine lange Inkubationszeit und den fehlenden HB-Ag-Nachweis charakterisiert.

Almeida und Mitarbeiter (1) beschrieben als erste das HB-Ag in seinen verschiedenen elektronenmikroskopischen Erscheinungsformen. Im wesentlichen lassen sich drei Formen von Partikeln unterscheiden:

1. kleine, rundliche oder ovaläre von 15o - 25o A° Durchmesser
2. stabförmige, manchmal tubulöse mit einem Durchmesser von 15o - 25o A° und einem Vielfachen davon an Länge,
3. große rundliche, mit einem durchschnittlichen Durchmesser von etwa 41o A° (etwas kleinere von 39o - 41o und etwas größere von 43o - 46o A° Durchmesser, später als sog. Dane - Partikel bezeichnet).

In der Elektrophorese wandert HB-Ag wie ein α_2-Globulin, chemisch handelt es sich um ein Lipoprotein mit einem RNS-Gehalt von 5 % (41.)

Das HB-Ag, dessen Sedimentationskonstante mit 4o 7 S und dessen Dichte mit 1,16 g/cm^3 angegeben wird (72, 73) galt über lange Zeit hin als immunologisch monospezifisch reagierende Substanz. Später konnte seine serologische Heterogenität nachgewiesen werden. Danach sind im wesentlichen drei antigene Determinanten des HB-Ag gefunden worden, a, d und y, die allerdings für den Verlauf der Erkrankung nicht von Bedeutung, epidemiologisch aber relevant sind.

Alle untersuchten "Australia-Antigene" besitzen die gemeinsame Determinante "a"; weiter wurden die Determinanten "d" und "y" ermittelt, die zusammen mit "a" vorkommen, sich gegenseitig aber ausschließen, so daß sich die Kombination "ad", auch kurz "D", und "ay" - "Y" ergeben. Dazu kommt die Determinante "x", die wahrscheinlich wirtsspezifisch ist und beim Menschen, nicht aber bei anderen Primaten, vorkommt, und weitere antigene Determinanten wie z.B. die mit Kaninchen-Antiseren nachgewiesenen "w" und "r", die in den Kombinationen "adw", "ayw" und "adr" vorkommen (13, 14, 74, 86). Später (18) gelang es Oberflächen-oder Surface-Antigen (HBs-Ag) von Core- oder HBc-Antigen, das den inneren Kern der Dane-Partikel ausmacht, zu isolieren und sie weiter elektronenmikroskopisch und immunologisch zu untersuchen.

Daneben findet man bei einem Teil der Patienten mit akuter Hepatitis das 1972 zum erstenmal nachgewiesene "e"-Antigen (46, 62). Die "e"-positiven Patienten unterscheiden sich von den "e"-negativen durch im Durchschnitt niedrigere Bilurubin- und Transaminasenwerte, Sie zeigen aber

häufiger Übergänge in chronische Verlaufsformen. Neben der Bestimmung des HBs-Antigens, der Antikörper gegen HBs- und HBc-Antigen im Blut und des HBc-Antigens in den Leberzellkernen haben der "e" und anti-"e"-Nachweis heute die größte klinische Bedeutung.

Eine Darstellung des HBs-Antigen in weitgehend gereinigter Form ist durch Differentialzentrifugation, Säulenchromatographie und enzymatische Behandlung im Serum (56) möglich. Nach den Kenntnissen der biophysikalischen und biochemischen Eigenschaften vereinigt das Australia-Antigen virale und Wirtsantigene in sich. Die Frage, wieweit diese im erkrankten Organismus Anlaß zu immunologischen Reaktionen geben, ist nicht endgültig geklärt.

1.3 Zelluläre und humorale Immunphänomene bei akuter und chronischer Hepatitis

Im Verlauf der akuten Virushepatitis A und B werden fremde Substanzen im Organismus nachgewiesen (wie z.B. Hepatitis B-Antigen, α-Foetoprotein), die antigen wirken und immunologische Reaktionen auslösen. Sowohl das humorale Immunsystem (repräsentiert durch die B-Lymphocyten) als auch das zelluläre Immunsystem (repräsentiert durch die T-Lymphocyten) kann durch diese Substanzen sensibilisiert werden; oder aber es können diese Antigene immunologisch toleriert werden.

Die immunologischen Reaktionen sind z.T. organunspezifisch, d.h. nicht leberspezifisch. Inwie-

weit es sich um pathogenetisch wichtige Phänomene oder nur um Begleitreaktionen handelt, konnte bis jetzt nicht vollständig geklärt werden.

Vielfältige humorale Reaktionen wurden beobachtet: leichte Erhöhung des Serumglobulinspiegels, eine schneller und länger anhaltende Ig-M-Vermehrung, ein langsamerer und kürzer anhaltender IgG Anstieg (75), die Bildung von Auto-Antikörper gegen glatte Muskulatur und gegen Mitochondrien bei einem Teil der Patienten, das Auftreten von Antikörpern gegen "e" Antigen und von Immunkomplexen (2) unter Komplementverbrauch (erniedrigte Werte für die 4-Komplementkomponente, von C_3, C_4 und Gesamtkomplement) etc.

Im Rahmen der Untersuchung der zellulären Immunphänomene sind zahlreiche Hautteste durchgeführt worden, jedoch nur vereinzelt mit spezifischen Antigenen. Die Hautreaktionen mit Tuberkuloprotein, Dinitrochlorbenzol und anderen unspezifischen Antigenen blieben im Normbereich. Eine Ausnahme machen die Patienten mit chronischer Hepatitis, bei denen verminderte oder abgeschwächte Hautreaktionen im Sinne einer verzögerten Überempfindlichkeit gefunden wurden (84, 9o).

Weiter wurden erniedrigte relative und absolute Zahlen von T-Lymphozyten, erhöhte Zahlen von "Null"-Zellen und das Auftreten von aktivierten Lymphozyten im peripheren Blut beobachtet (84, 9o).

Gesteigerte DNS-Synthese der Lymphozyten, gesteigerte Phytohaemagglutinin-Stimulierbarkeit der Lymphozyten, geringe Lymphozyten-Proliferation

gegenüber HB-Ag bei einem Teil der Patienten mit chronischem Krankheitsverlauf, die Bildung von migrationsinhibierendem Faktor in Gegenwart von HB-Ag und von leberspezifischen Lipoprotein durch Lymphozyten bei einem Teil der Patienten mit Hepatitis B sind in vitro Reaktionen, die eine zelluläre Immunität nachweisen (84, 9o).

Durch den Nachweis der verschiedenen Immunphänomene hat man zunächst versucht, differentialdiagnostische und prognostische Hinweise für die Entwicklung der verschiedenen Verlaufsformen zu gewinnen.

Für die Pathogenese einer Lebererkrankung ist nicht nur die Anwesenheit des infektiösen Agens von Bedeutung, sondern vor allem die Art der Immunreaktion des Wirtsorganismus, die weitgehend genetisch determiniert ist. Für die in einem entscheidenden Anteil genetische Bestimmung dieser Reaktionsformen sprechen das parallele Verhalten der Antikörperbildung gegen Gm-Typen und "low-density" Lipoproteine und der rezessive Vererbungsgang der Anlage, im Falle eines Kontaktes mit dem Erreger der Virushepatitis B eine HBs-Ag-Persistenz zu entwickeln, die auch bei angeborener (z.B. Down'-Syndrom), erworbener (z.B. lymphatische Systemerkrankung, M. BOECK, Lepra), toxisch bedingter (z.B. chronische Niereninsuffizienz) oder therapeutisch induzierter (z.B. Glukocorticosteroide, Cytostatika, Immunosuppressiva) T-Lymphozyten-Defizienz gehäuft vorkommt.

Unter der Berücksichtigung der humoralen und zellulären Immunreaktionen sowie der klinischen und laborchemischen Daten und der morphologischen

Veränderungen des Leberparenchyms bei den verschiedenen Verlaufsformen der Hepatitis konnten neue Hypothesen über die Pathogenese der Hepatitis aufgestellt werden.

So sind Dudley, Fox und Sherlock (22) der Meinung, daß es nach einer Infektion mit Hepatitis B -Virus zur Immunreaktion der T-Lympocyten kommt, die gegen alle infizierten Zellen gerichtet ist, sie führt zu deren Nekrose aber gleichzeitig auch zur Eliminierung des infektiösen Agens. Die klinische Verlaufsform der Hepatitis hängt von der Zahl der infizierten Zellen sowie anderen Faktoren wie Virulenz und Dosis des infektiösen Agens ab. Ein gesunder HB-Ag-Träger resultiert, falls die Immunreaktion der T-Lymphocyten unspezifisch bleibt (nicht gegen infektiöses Agens und Hepatocyten); es kommt nicht zur Leberschädigung, das HB-Ag wird bei normaler Leberfunktion weiter produziert. Falls die T-Lymphocyten-Tätigkeit vermindert ist, so resultieren zwar Nekrosen von infizierten Zellen, die Immunreaktion ist aber nicht ausreichend, um alle infizierten Zellen zu zerstören, es kommt zum subklinischen Verlauf der Hepatitis mit fortschreitender Leberzellstörung und weiterer Produktion von Antigen. Das Ausmaß der Immunreaktion bestimmt weiter, ob sich eine chronisch aggressive oder chronisch persistierende Hepatitis entwickelt.

Popper und Mackay (65) nehmen an, daß der chronischen Verlaufsform der Hepatitis eine fortschreitende Immunreaktion gegen das persistierende Virus oder wahrscheinlicher noch gegen das komplex aufgebaute HBs-Antigen zugrunde liegt. Dabei sind Antigen und Antigen-Antikörper-Komplexe in den

Zellen (Hepatocyten) anwesend, wo auch HBs-Ag produziert und ausgeschwemmt wird. Danach kann sich der Virus in verschiedenen Organen isoliert oder als Immunkomplex ablagern (z.B. Polyarthritis, Polyarteritis). Als chronisch aggressive autoimmune Reaktion bezeichnen sie die immunologische Reaktion, die gegen spezifische alterierte Proteine des Wirts gerichtet ist, die ursprünglich in das HBs-Antigen eingegliedert waren und die auch in Abwesenheit des infektiösen Agens noch vorhanden sind und zur fortgesetzten Unterhaltung der Immunreaktion Anlaß geben können. Die klinischen Manifestationen der chronischen Hepatitis werden durch die Viruspersistenz einerseits und andererseits durch die spezifische antigene Komponente des HBs-Ag (Leberzellmembranproteine - virusalteriert - sog. Autoantigene) sowie die Organlokalisation der entsprechenden Immunkomplexe bestimmt.

In der eigenen Arbeitsgruppe wurde die folgende Arbeitshypothese aufgestellt (88): Demnach kommt es nach einer Infektion mit Hepatitis-B-Virus (z.B. mit einem HBs-Ag-haltigen Serum) zu einer vorübergehenden Antigenaemie. Dann erreichen die Erreger die Zellen (z.B. die Hepatocyten, aber wohl auch andere Zellen), wo sie sich während der Latenzzeit, also während der Inkubationsphase, akkomodieren, dann vermehren und schließlich die Zellen verlassen, ohne sie offensichtlich zu zerstören. Das HB-Ag erscheint erneut im Serum, der positive HB-Ag-Nachweis geht bis zu ca. 3 Wochen dem ersten Anstieg der Transaminasenwerte und weiter noch dem der Bilirubinwerte voraus. Man nimmt also an, daß die Leberzelle

nicht durch das Virus selbst, sondern erst durch die humoralen und vor allem zellulären Immunreaktionen, die nicht nur gegen den Virusanteil, sondern auch gegen den Wirtsproteinanteil im HB-Ag - und damit kreuzreagierend gegen die Leberzelle - gerichtet sind, zerstört werden. Für den weiteren Verlauf der Erkrankung ist das Ausmaß der zellulären und humoralen Immunreaktionen und die Kombination dieser einzelnen Faktoren weitgehend bestimmend. Starke Reaktionen führen zu einem starken Ikterus und hohen Transaminasenwerten, der Erreger wird aber auch rasch eliminiert, und es kommt zur Genesung. Schwache Reaktionen führen zu anikterischen, oft subklinischen, aber auch protrahierten Verläufen mit häufigerem Übergang in chronische Formen, sowie zu einer HBs-Ag- bzw. Virus-Persistenz. Bei außergewöhnlich starker Reaktion kommt es zur fulminanten Hepatitis, bei immunologischer Toleranz dagegen bleiben Erkrankung und Erregerelimination aus, und es resultiert ein sog. gesunder HBs-Ag-Träger.

1.4 Experimentelle Untersuchungen der zellulären Immunreaktionen in vitro

Für experimentelle Untersuchungen der zellulären immunologischen Reaktionen stehen in vitro im wesentlichen folgende Methoden zur Verfügung:

1. Die Bestimmung des "spontanen" Nukleinsäurestoffwechsels der Lymphocyten
2. die Lymphocytenstimulation durch unspezifische Mitogene wie das Phytohaemagglutinin (PHA) als unspezifischer Parameter der Reaktionsfähigkeit immumkompetenter Zellen

3. die Lymphocytenstimulation durch spezifische Antigene (z.B. HB-Ag)
4. die Bestimmung der Mediatorenfreisetzung aus sensibilisierten Lymphocyten nach Kontakt mit dem spezifischen Antigen (z.B. HB-Ag oder leberspezifischem Lipoprotein), also eines Mediators wie des migrationsinhibierenden Faktors (MIF)
5. Cytotoxizitätstests (Lymphocyten gegen Zielzellen)

ad 1) Der "spontane" Nukleinsäurestoffwechsel kann durch die Messung der 3H-Thymidin-Einbaurate erfaßt werden. In der akuten Phase der Hepatitis werden bei 5 - 33 % (84) der Patienten im peripheren Blut "Virocyten" beobachtet. Bei ihnen handelt es sich um aktivierte Lymphocyten mit einem gesteigerten DNS-, RNS- und Proteinstoffwechsel. Als ein weiteres Beispiel von in vitro erfolgten Interaktionen zwischen Virus und Lymphocyten ist die in direkten Chromosomenpräparationen beobachtete erhöhte Anzahl an spontanen Mitosen, sowie die außergewöhnlich leichte Übernahme der Lymphocyten in Langzeitkulturen (31) anzusehen.

ad 2) Die Ergebnisse der Phytohaemagglutinin-Stimulierbarkeit der Lymphocyten waren unterschiedlich. So stellten Rössler und Havemann (69) erniedrigte Werte fest, einige Autoren fanden normale Werte. Später, unter standardisierten Bedingungen (85) wurde sogar eine Steigerung der Phytohaemagglutinin-Reaktivität der Lymphocyten unter bestimmten Bedingungen beobachtet.

ad 3) Bei in vitro-Reaktionen mit HB-Ag zeigten die Lymphocyten von Patienten mit einer Virushepatitis B in der späten Phase der Erkrankung und in der Rekonvaleszenz zu etwa 5o % Reaktionen; dabei lagen die Stimulationsraten nur beim 2,9-fachen der Norm. Bei Patienten mit chronisch aktiver Hepatitis fiel die Reaktion seltener positiv aus, und sie war auch noch schwächer ausgeprägt (7o)

ad 4) Das Auftreten von migrationsinhibierendem Faktor (MIF) in vitro wird als Ausdruck einer Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ, wie sie etwa vom klassischen Beispiel der Tuberkulinhautreaktion her bekannt ist, aufgefaßt. Dem MIF - Test liegen folgende Beobachtungen zugrunde: Isolierte periphere Granulocyten und Monocyten wandern in Kulturmedien aus Kapillaren bäumchenförmig auf einer Glasfläche aus, gleichgültig ob Antigene anwesend sind (es sei denn, sie lägen in toxischen Konzentrationen vor).Falls Lymphocyten mit Antigenen, gegen die sie vorsensibilisiert sind, in Kontakt kommen, produzieren die Lymphocyten eine Reihe von Faktoren, die als Mediatoren der zellulären Immunität gelten. Einer von diesen, dem in der letzten Zeit viel Aufmerksamkeit gewidmet wurde, ist der migrationsinhibierende Faktor (MIF), der die Wanderung von Granulocyten und Monocyten hemmt. Der MIF kann direkt oder indirekt getestet werden:
Bei der direkten Methode wird das Antigen zu den wandernden Indikatorzellen und den reagierenden Lymphocyten zugegeben. Bei dem indirekten Verfahren wird MIF nach Zusatz von Antigen von sensibilisierten Lymphocyten in Lymphocyten-

kulturen gebildet. Die Lymphocytenkulturüberstände werden dann mit Indikatorzellen (Granulocyten, Monocyten) eines anderen Spenders auf ihre migrationsinhibierende Aktivität getestet.

Als erstes berichten Rich und Lewis (68) über Versuche mit Milz- und Lymphknotenzellen von mit Tuberkulin sensibilisierten Ratten und deren Wanderungshemmung unter Zugabe von Tuberkulin zum Kulturmedium. Später wurde durch George und Vaugham (29), David und seinen Mitarbeitern (19) und Bloom und Bennet (1o) die MIF-Test-Methode entwickelt und die Migrationshemmung der Zellen von Peritonealexsudaten von Meerschweinchen beschrieben. Søborg und Bendixen benutzten zum ersten Mal als Indikatorzellen menschliche Leukocyten (buffy coat) für die MIF-Testung und berichten über gute Ergebnisse (9, 14, 81, 82, 83) im Gegensatz zu Kaltreider (42), Alzer (3) und Sodomann und Mitarbeiter (87), die keine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse mit diesen Indikatorzellen brachten. Die Methoden zur MIF-Aktivität-Testung sind mehrmals modifiziert worden (25, 35, 36, 71).
1971 testeten Clausen (15, 16) sowie Weisbart und Mitarbeiter (96) MIF mit einer neuen Agar-Gel-Methode im direkten und indirekten Verfahren, wobei sie als Indikatorzellen ebenfalls menschliche Leukocyten benutzten. Etwa zur gleichen Zeit wurde von Sodomann und Mitarbeitern (87) die MIF-Aktivität im zweizeitigen System getestet; sie korrelierten die Ergebnisse mit parallelen Hauttestergebnissen, was auch von Astor und Mitarbeitern (4)

sowie Senyk (79) parallel erarbeitet wurde; Verhältnis zwischen den in vitro-Parametern (Lymphocytentransformation und MIF-Produktion) und den in vivo-Parametern der zellulären Immunität (Hautteste als Überempfindlichkeitsreaktion).

ad 5) Die mit dem Cytotoxizitäts-Testen erbrachte Lyse von Kaninchenhepatocyten durch Lymphocyten bei experimenteller chronischer Hepatitis sind noch schwierig zu beurteilen, da die spontane Lyse der Hepatocyten nach ihrer Isolierung sehr hoch ist (63).

1.5 Bisherige Ergebnisse der Untersuchungen der zellulären Immunreaktion in vitro

Inzwischen sind auch Untersuchungen der MIF-Aktivität bei der Virushepatitis unternommen worden, wobei als Antigene homologe Leberantigene und bei der Virushepatitis B auch HBs-Ag eingesetzt wurden.

Einige Autoren berichten über eine Wanderungshemmung bei der akuten HBs-Ag-positiven Hepatitis (23, 43, 95), es sind aber auch negative Ergebnisse erhoben worden (53). Bei der akuten HBs-Ag-negativen Hepatitis wurde bis jetzt keine Wanderungshemmung der Leukocyten beobachtet (39, 43, 53). Bei der chronisch persistierenden Hepatitis und in den meisten Arbeiten (53, 55, 95) bei der chronisch aggressiven, sowie bei kryptogener Zirrhose (52, 55) fand man einen positiven MIF-Test. Unterschiedliche Ergebnisse des MIF-Tests liegen bei Patienten nach einer akuten HBs-Ag-positiven Hepatitis (27, 39) und sogar bei der Alkohol-induzierten Hepatitis (39, 53) vor.

Die Arbeiten sind z.T. schlecht vergleichbar, da unterschiedliche Methoden und Untersuchungsgruppen verwandt wurden und die Krankheitsdifferenzierung entsprechend dem HBs-Ag-Nachweis in den älteren Arbeiten gefehlt hat.

1.6 Aufgabenstellung

Klinische und experimentelle Beobachtungen haben zu der Annahme geführt, daß zelluläre Immunreaktionen für den Verlauf einer akuten Virushepatitis B eine entscheidende Bedeutung haben. Möglicherweise entscheiden Art und Ausmaß der zellulären Immunreaktionen eines infizierten Organismus nach oralem oder parenteralen Kontakt mit dem Hepatitis-B-Virus, ob in einem Fall eine Hepatitis-Erkrankung entsteht, im anderen - etwa durch immunologische Toleranz - ein gesunder Virusträger resultiert.

Es ist bislang aber nicht endgültig gelungen zwischen begleitenden und pathogenetisch wirksamen Immunreaktionen zu unterscheiden. Eine Vorausbedingung dazu ist die genaue Kenntnis einzelner zellulärer Reaktionen und insbesondere ihres Verlaufs. Rother (7o) hat über Veränderungen der spontanen und mitogenstimulierbaren Lymphocyten-Proliferation im Verlauf der akuten und chronischen Hepatitis berichtet. Nach Kenntnis dieser mehr unspezifischen Lymphocyten-Proliferationsänderungen bei der Hepatitis erhob sich die Frage nach Antigen-spezifischen lymphocytären Reaktionen, insbesondere solchen zellulär-immunologischer Natur. Eine der am häufigsten angewandten Nachweismethoden einer zellulären Immunreaktion ist der MIF-Test. Für die Hepatitis sind

mit diesem Test positive Lymphocytenreaktionen durch HB-Ag und leberspezifisches Lipoprotein (43, 52) beschrieben worden. Allerdings sind solche Untersuchungsergebnisse kritisch zu beurteilen, da mit unspezifischen (dann falsch positiven) Wanderungseffekten gerade bei Leberkranken zu rechnen ist, etwa durch den von Schumacher und Alzer beschriebenen Faktor (76).

Frühere Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen haben zu divergierenden Ergebnissen geführt (s.o.). Darum sollte in der vorliegenden Arbeit der Frage nachgegangen werden, ob eine zelluläre Immunreaktion gegen HB-Ag von Lymphocyten bei Patienten mit akuter und chronischer Hepatitis mit dem MIF sicher erfaßbar ist, und gegebenenfalls, wie sie sich im Krankheitsverlauf verhält.

2. Material und Methoden

2.1 Die untersuchten Patientengruppen

1. Patienten mit akuter HBs-Ag positiver Hepatitis in der frühen Phase der Erkrankung, d.h. vor Erreichen des Transaminasen-Gipfels und während der ersten 1o Tage nach Auftreten des Ikterus oder der Bilirubinurie.
2. Patienten mit akuter HBs-Ag positiver Hepatitis in der späten Phase der Erkrankung, d.h. nach dem Erreichen des Transaminasen-Gipfels und später als am 1o. Tag des Ikterus.
3. Patienten mit akuter HBs-Ag negativer Hepatitis in der frühen Phase der Erkrankung
4. Patienten mit akuter HBs-Ag negativer Hepatitis in der späten Phase der Erkrankung

Die Diagnose der akuten Hepatitis wurde aufgrund der typischen klinischen Symptome, charakteristischen Laborbefunde und durch eine Leberblindpunktion mit entsprechendem histologischen Befund (falls eine Punktion nicht durch Gerinnungsstörungen oder Patientenweigerung unterblieb) gestellt.
Als "Virushepatitis A" wurden nur die Patienten in die Versuchsreihe aufgenommen, bei denen im Serum HBs-Ag während des Verlaufs der Erkrankung nicht nachgewiesen werden konnte und die anamnestisch keinen Anhalt für die Möglichkeit einer parenteralen Infektion boten (keine Transfusionen, kein Kontakt mit Virushepatitis B - Kranken, keine früher durchgemachte Hepatitis etc.).

Hepatitis A-Virusnachweise im Stuhl wurden nicht geführt, da diese Untersuchungsmethode noch nicht in der klinischen Routineuntersuchung etabliert war.

5. Rekonvaleszenten nach einer HBs-Ag-positiven Hepatitis im Zeitraum zwischen 6 Wochen - 12 Monaten, deren Transaminasen- und Bilirubinwerte bereits im Normbereich waren und bei denen HBs-Ag nicht mehr nachweisbar war.
6. Patienten mit chronisch persistierender HBs-Ag-positiver Hepatitis
7. Patienten mit chronisch persistierender HBs-Ag negativer Hepatitis
8. Patienten mit chronisch aggressiver HBs-Ag positiver Hepatitis
9. Patienten mit chronisch aggressiver HBs-Ag negativer Hepatitis
10. Patienten mit HBs-Ag positiver Lebercirrhose
11. Patienten mit HBs-Ag negativer Lebercirrhose

Auch die Patienten mit chronisch persistierender Hepatitis hatten einen typischen histologischen Befund in den Leberpunktionen wie sie 1968 von De Grote und Mitarbeitern (3o) beschrieben und definiert wurden, einen Verlauf der Erkrankung über 1 Jahr und fakultative Befunde wie Bilirubinwerte über 1 mg%, oder SGOT-, SGPT-Werte über 3o mU/ml (12 mU/ml: obere Normgrenze) oder alkalische Phosphatase über 6o mU/ml (4o mU/ml obere Normgrenze) oder Kombinationen von diesen Werten.
Als chronisch aggressive Hepatitis galten die Fälle, die ebenfalls einen typischen Histologie-Befund oder fakultativ eine γ-Globulin-Fraktion über 25 Relativ% oder 2 g% oder ein IgG über 1ooo mg% oder eine Kombination davon aufwiesen.

Zum Vergleich sind klinisch gesunde Personen ohne Hepatitis – Anamnese mit negativen HBs-Ag Befund im Serum und übrigen Laborbefunden ebenfalls im Normbereich im MIF-Test untersucht worden.

2.2 Verwendete Methoden

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Austestung der Migrationshemmung von Leukocyten bei Patienten mit verschiedenen Lebererkrankungen die zuerst von Clausen (15, 16) 1971 beschriebene, 1974 von Ax und Mitarbeitern modifizierte einzeitige Agar-Gel-Methode angewandt. Als Antigen wurde weitgehend gereinigtes (bis auf Spuren von α_2-Makroglobulin und IgM), angereichertes, lösliches HBs-Ag, das aus dem Serum HBs-Ag-positiver Hepatitis-Kranker isoliert wurde, verwendet. Dazu wurden Seren mit HBs-Ag vom Subtyp "ad" und "ay" gemischt und einer enzymatischen Verdauung mit Pepsin unterworfen

(2 %, 3o', 37° C), durch die die Serumbestandteile bis auf Reste (s.o.) abgebaut, das HBs-Ag aber - zumindest hinsichtlich seiner immunologischen Reaktionsfähigkeit - nicht verändert wurde. Das gewonnene Material wurde nach Pepsininaktivierung (Neutralisierung mit NaoH) dialysiert und auf die zehnfache Konzentration eingeengt. Danach erfolgte die Testung der Präparation mittels Immunelektrophorese und mit Anti-HBs-Ag in der Immundiffusion nach Ouchterlony sowie in der Überwanderungselektrophorese nach Pesendorfer (64). Kleine aufgeteilte Chargen-Anteilen der Präparation wurden zum jeweiligen Gebrauch in Einzelexperimenten bei - 2o° C eingefroren. Parallel wurden Kontrollpräparationen aus Normalserum-Gemischen hergestellt, getestet und verwandt.

Um eine etwaige unspezifische Hemmung zu erfassen, wurde die Leukocytenwanderung der einzelnen Spender im selben Versuch unter Zusatz von "AB-pool" Serum zum Medium gemessen. Dieser wurde aus Blut der Blutgruppe AB von freiwilligen, klinisch gesunden Spendern, deren sämtliche oben aufgeführte Labordaten im Normbereich waren, gewonnen, auf HBs-Ag (Radioimmunoassay) und lymphocytotoxischen Faktor (48) untersucht und negativ befunden und dann in kleinen Mengen, die jeweils für einen Versuch ausreichte, bei - 2o° C eingefroren.

Um den Gedanken, daß unter Anwesenheit von Antigen MIF von Lymphocyten produziert wird, der die Wanderung von Granulocyten und Monocyten in vitro hemmt, zu stützen, sind Vorversuche mit tuberkulin-positiven und tuberkulin-negativen Spendern durchgeführt worden, wobei einzeitige und zweizeitige Migrations-

inhibitions-Versuche durchgeführt wurden. Bei dem zweizeitigen Migrationsinhibitionstest sind zuerst Lymphocytenkulturen von tuberkulin-positiven und -negativen Spendern mit und ohne Zusatz von Tuberkuloprotein durchgeführt worden. In der zweiten Phase wurde - ähnlich der einzeitigen Methode - die Wanderung von Indikatorleukocyten tuberkulin-negativer Spender mit dem Zusatz von zellfreien Überständen aus den Lymphocytenkulturen getestet.

2.3 Verwendete Substanzen und Chemikalien

Als Kulturmedium für die Lymphocytenkulturen sowie für den MIF-Test benutzten wir TC 199 der Fa. Difco Laboratories, Detroit, Michigan, das mit 1o %-igem Natriumbicarbonat gepuffert wurde. Zur Zellisolierung für die Lymphocytenkulturen wurden Ficoll der Fa. Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala und Ronpacon® (Sodium Metrizoat) der Fa. Dr. Molter GmbH, Heidelberg in einer Standardlösung verwendet (32).

2.4 Die Vorversuche

2.4.1 Der einzeitige Migrationsinhibitionstest

In den Vorversuchen wurde die Migrationshemmung bei Leukocyten von tuberkulin-positiven und -negativen Spendern mit und ohne Zusatz von Tuberkuloprotein als Antigen im einzeitigen Migrationsinhibitionstest gemessen. Die entsprechende Hautteste der Spender waren bekannt und lagen mindestens 4 Wochen und nicht mehr als 1 Jahr zurück.

2.4.2 Herstellung der Agarose

Zur Herstellung der Agarose wurde 1,2 g Agarose der Behring-Werke Ag, Marburg, in 45 ml Aqua bidest im Wasserbad bei 9o - 1oo° C aufgelöst und auf 42 ° C abgekühlt. Der Lösung wurden dann 45 ml gepufferten Mediums TC 199, das doppelt so hoch konzentriert war wie in normalen Ansätzen von Zell-Kulturnährlösungen, und 1o ml des standardisierten "AB-pool"-Serums zugegeben und gut gemischt. Je 5 ml dieses Gemisches wurde in oberflächen-behandelte Plastikpetrischalen von 5o mm Durchmesser der Fa. Greiner, Neurtingen, abpipettiert und abgekühlt. In die gelierte Agarose wurden acht Löcher von 2,5 mm Durchmesser und 6 µl Inhalt mit einer entsprechenden Hohlstanze in einem Halter und unter Wasserstrahlpumpen-Sog ausgestanzt.

2.4.3 Gewinnung von Leukocyten

Zur Gewinnung der Leukocyten wurden etwa 3o ml heparinisiertes Blut (1o IE Heparin/1 ml Blut) steril von den Spendern abgenommen, mit Dextran (6 % Macrodex®) im Verhältnis 4 : 1 gemischt, zur Sedimentation bei 37° C 3o - 6o Minuten lang in Schrägstellung aufgestellt. Der leukocytenreiche Überstand wurde abgehoben, zuerst 8 - 1o Minuten bei 8oo g zentrifugiert und anschließend mit Medium TC 199 unter Zusatz von Heparin (1 IE Heparin/ 1 ml Medium) dreimal gewaschen. Mit Kapillaren wurden jeweils 1,2 x $1o^6$ Zellen pro Loch in der Agarose eingefüllt, wobei die Hälfte der Stanzlöcher jeder Petrischale die Zellsuspension mit Zusatz von 2o g Tuberkuloprotein/1 ml Zellsuspension,

die andere Hälfte die Zellsuspension ohne Tuberkuloprotein, jedoch Medium im entsprechend gleichen Volumen (6 µl) erhielt. Anschließend wurden die Ansätze in einem feuchtigkeitsgesättigten Brutschrank bei 37° C und 5 % CO_2 18 - 24 Stunden lang inkubiert.

Die Fixierung von Leukocyten an der Petrischalenoberfläche wurde mit Methanol und nach 1o Minuten für etwa 1/2 Stunde mit 4o %-igem Formalin durchgeführt. Danach konnte die Agarose gut entfernt werden, ohne daß die Leukocytenmigrationshöfe auf dem Boden der Petrischale zerstört wurden. Nach Färbung mit May-Grünwald-Giemsa wurde der Radius der einzelnen Migrationshöfe unter Lupenbedingungen gemessen.

2.4.4 Berechnung und Auswertung der Migration

Zur Auswertung wurden die Migrationsindices berechnet

$$MI = \frac{\text{Wanderungsradius mit Antigen}}{\text{Wanderungsradius ohne Antigen}} \quad X \quad 1oo$$

Die Streuung der Wanderungswerte unter Normalbedingungen (Kontrollen) wurde mit dem Students't-Test berechnet.

2.4.5 Der zweizeitige Migrationsinhibitionstest

Bei dem zweizeitigen Migrationsinhibitionstest handelt es sich um eine Methode, bei der die MIF-Bildung und -Austestung in zwei getrennten Systemen mit Zellen von menschlichen Spendern erfolgt.

2.4.6 Die Lymphocytenkulturen

Zur Bildung von migrationsinhibierendem Faktor (positive Kontrolle) sind zuerst Lymphocytenkulturen mit Lymphocyten von tuberkulin-positiven Spendern mit Zusatz von Tuberkuloprotein angesetzt worden. Die für die Kulturen verwendeten Lymphocyten wurden aus heparinisiertem Venenblut, das in Fernwall^{R}-Beuteln abgenommen und bei 37^{o} C zur Sedimentation der Erythrocyten aufgestellt worden war, isoliert. Danach wurde das leukocytenreiche Plasma mit der Ficoll-Ronpacon^{R}-Mischung (s.o.) im Verhältnis 1 : 1 unterschichtet und 2o Minuten bei 16oo - 18oo g bei 4^{o} C zentrifugiert. Anschließend wurde die lymphocytenreiche Grenzschicht zwischen Plasma und Ficoll-Schicht abgehoben, im Medium TC 199 (mit Heparinzusatz) aufgenommen und bei Raumtemperatur 1o Minuten bei 1ooo g abgeschleudert. Das Zellsediment wurde noch zweimal im frischen Medium TC 199 mit Heparinzusatz und zum Schluß noch einmal im Medium TC 199 ohne Heparinzusatz gewaschen. Nach dem letzten Vorgang wurde die Zellzahl der Lymphocyten, Granulocyten und Monocyten in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Das für die Kulturansätze verwendete Medium TC 199 wurde mit 1oo g Penicillin/ml, 1oo g Streptomycin/ml und 15 % AB-Serum versetzt. Die Zellsuspension wurde mit diesem Medium so verdünnt, daß Einzelkulturen 1,5 x 1o^{6} Zellen/ml, 4,5 x 1o^{6} Zellen/ml oder 7,5 x 1o^{6} Zellen/ml enthielten. Die Kulturen wurden in sterilen konischen Zentrifugenröhrchen angesetzt, als Antigen wurde 2o µg/ml Tuberkulin GT 1 : 1ooo (Behring-Werke AG, Marburg) zu den unterschiedlichen Zellsuspensionen zugegeben. Die Röhrchen wurden steril

mit Aluminiumfolie verschlossen und im Brutschrank bei 37°C , 5 % CO_2-Begasung und gesättigter Luftfeuchtigkeit in schräger Lage (∢ 45°) inkubiert. Nach 72 Stunden wurde die Inkubation abgebrochen, die Lymphocytenkulturen durch Zentrifugation bei 1ooo g zuerst von Zellen, dann bei 3o.ooo g auch von Zellorganellen befreit.

Gleichzeitig sind Kontrollkulturen angesetzt worden, die ohne Tuberkulin blieben. Weitere Kontrollkulturen wurden erst nach dem Kulturende mit Tuberkuloprotein versetzt (Rekonstitution mit dem Antigen zum Ausschluß einer antigenabhängigen MIF-Wirkung).

In der zweiten Phase des Versuchs wurden die Lymphocytenkulturüberstände auf ihre MIF-Aktivität getestet, wobei als Indikatorzellen periphere Leukocyten von tuberkulin-negativen und -positiven Spendern verwendet wurden. Die isolierten Leukocyten (aus heparinisiertem Venenblut, Methode s. 2.4.3) wurden eine Stunde lang in 1 ml der Kulturüberstände inkubiert (3,6 x $1o^6$ Zellen/ml) und dann ähnlich wie bei dem direkten Migrationsinhibitionstest in die Löcher der Petrischale eingefüllt und 18 - 24 Stunden lang inkubiert. In jedem Versuch standen zur Auswertung Leukocytenmigrationshöfe von Leukocyten, die

1) nur im Medium TC 199
2) im Lymphocytenkulturenüberstand mit Tuberkulin versetzter Kulturen
3) im Kulturüberstand ohne Zusatz von Tuberkulin und
4) im mit Tuberkulin rekonstituierten Kulturüberstand

präinkubiert worden waren, zur Verfügung.

2.5 Die Hauptversuche

In den Hauptversuchen wurde der direkte Migrationsinhibitionstest bei Patienten mit verschiedenen Lebererkrankungen durchgeführt, wobei die Leukocytenwanderung im Eigenserum, sowie unter Zusatz von HBs-Ag-Präparation und schließlich der Normal-Kontroll-Präparation verglichen wurde.

3. Ergebnisse

Mit der von Ax et al. (5) modifizierten Agar-Gel-Methode nach Clausen (15, 16) wurde versucht, eine spezifische Sensibilisierung von Lymphocyten durch ihre MIF-Bildung bei verschiedenen Lebererkrankungen zu erfassen.
Um zu zeigen, daß die Wanderung von Leukocyten tatsächlich durch MIF, der bei einer Antigen-Lymphocyten-Interaktion durch spezifische immunologische Vorgänge aus den Lymphocyten freigesetzt wird, gehemmt wird, sind zuerst Vorversuche mit Lymphocyten, die sicher im Sinne einer zellulären Immunität sensibilisiert waren, hier bei tuberkulinpositiven und in der Kontrolle bei tuberkulinnegativen Spendern, durchgeführt worden. Dabei wurde der zweizeitige Test (87) mit der Agar-Gel-Methode (Clausen) verglichen. Die letztgenannte Methode wurde dann auch bei den verschiedenen Patientengruppen angewandt.

3.1 Der zweizeitige MIF-Test in den Vorversuchen

Die Untersuchungen mit der zweizeitigen Technik wurden bei 6 tuberkulinpositiven und 2 tuberkulinnegativen Spendern durchgeführt. Dabei wurden in der Primärkultur drei verschiedene Zelldichten von

Lymphocyten im Kulturansatz bei konstanter Konzentration von Tuberkuloprotein (PPD) verglichen. Als Indikatorzellen wurden in der zweiten Phase des Testes periphere Leukocyten von tuberkulinnegativen und tuberkulinpositiven Spendern verwendet, wobei kein signifikanter Unterschied der Wanderungshemmungen mit diesen beiden Indikatorzellarten erfaßt werden konnte. Der Bestimmung des Migrationsindex wurden der Wanderungsradius der Indikatorzellen nach Inkubation mit dem Lymphocytenkulturüberstand, der mit Zusatz von PPD erhalten worden war, und der Migrationsradius der Indikatorzellen unter dem Einfluß von Überständen primärer Lymphocytenkulturen ohne Zusatz von Antigen zugrunde gelegt.

Die zellfreien Überstände von PPD-versetzten Lymphocytenkulturen der tuberkulinpositiven Spender hemmten die Wanderung von Indikatorleukocyten signifikant ($p = 0{,}005$), wobei die migrationsinhibierende Wirkung der Überstände von Kulturen mit größerer Zelldichte ($4{,}5 \times 10^6$ Zellen/ml Kulturansatz und $7{,}5 \times 10^6$ Zellen/ml Kulturansatz) deutlicher waren, als bei einer Zelldichte von $1{,}5 \times 10^6$ Zellen (s. Abb. 1).

Die Untersuchungen mit den Überständen von Lymphocytenkulturen der tuberkulinnegativen Spendern zeigten keine signifikante Wanderungshemmung der Indikatorleukocyten (s. Abb. 1). Die Migrationshöfe dieser Indikatorzellen, sowie die der Indikatorzellen, die unter dem Einfluß von Überständen ohne Zusatz von Antigen in der Primärkultur standen, entsprachen den Migrationshöfen der Indikatorzellen, die im antigenfreien frischen Medium TC 199 voringkubiert worden waren.

Zusätzlich wurden zum Ausschluß eines etwaigen antigenabhängigen Migrationsinhibitionsfaktors Lymphocytenkulturüberstände erst nachträglich noch mit 2o µg PPD/ml rekonstituiert und dann an Indikatorzellen untersucht. Dabei ergab sich nie eine Änderung des Migrationsindex durch die Antigen-Rekonstitution.

3.2 Der einzeitige MIF-Test in den Vorversuchen

Der direkte einzeitige Migrationsinhibitionstest wurde zuerst bei 7 tuberkulinpositiven und 6 tuberkulinnegativen Spendern durchgeführt, wobei verschiedene Antigenkonzentrationen ausgetestet wurden. Mit den Zellen der tuberkulinpositiven Spender wurde bei 5 µg PPD/ml gelegentlich eine geringe, bei 2o µg PPD/ml eine deutliche und bei 5o µg PPD/ml keine darüber hinausgehende Wanderungshemmung ermittelt, so daß in den weiteren Versuchen nur noch 2o µg PPD/ml verwandt wurden. Die Zellen der tuberkulinnegativen Kontrollen ergaben keine signifikanten Wanderungshemmungen bei den drei Konzentrationen von PPD, so daß unspezifische - etwa toxische - Hemmungen der Wanderung von Indikatorzellen ausgeschlossen werden konnten.

Abb. 2 zeigt die Migrationsindices der tuberkulinpositiven und tuberkulinnegativen Spender mit dem einzeitigen MIT. Der Durchschnittswert bei tuberkulinpositiven Spendern ist MI = 8o, bei den tuberkulinnegativen Spendern beträgt der Wert MI = 99 und weicht damit praktisch nicht vom Ausgangswert (1oo %) ab. Beide Gruppen unterscheiden sich signifikant ($p = o,oo5 - o,o1$).

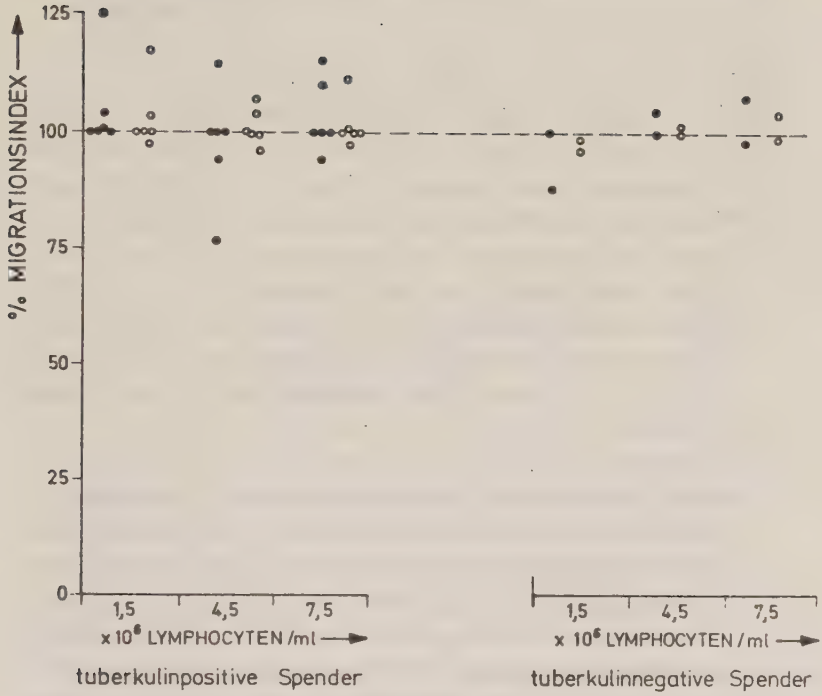

Abb. 1
Migrationsindices von tuberkulinnegativen ● und tuberkulinpositiven ○ Indikatorzellen nach Inkubation mit Überständen primärer Kulturen von Lymphocyten tuberkulinpositiver und tuberkulinnegativer Spender in unterschiedlicher Zelldichte mit Zusatz von 2o µg/ml PPD

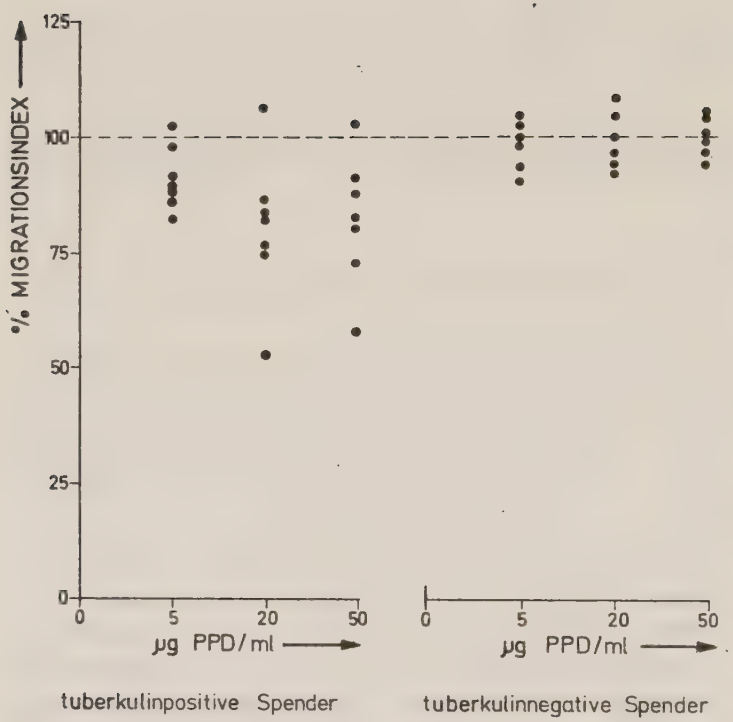

Abb. 2
Migrationsindices von Leukocyten tuberkulinpositiver und -negativer Spender bei unterschiedlichen PPD-Konzentrationen im einzeitigen MIF-Test (Clausen/Ax)

3.3 Die Einwirkung von HBs-Ag auf die Migration der Leukocyten der verschiedenen untersuchten Patientengruppen

Erst nach den beiden Vorversuchen (3.1 und 3.2), die sicher stellen sollten, daß mit der verwandten Methode tatsächlich MIF erfaßt wurde, konnten die Hauptversuche durchgeführt werden. Bei Patienten mit verschiedenen Lebererkrankungen wurde mit der modifizierten Clausen-Methode die Einwirkung von HBs-Ag auf die Migration der Leukocyten untersucht und jeweils im selben Versuch mit der Migration der Zellen in Gegenwart von Eigenserum und Normalserum-Kontroll-Präparation verglichen.

Abb. 3 zeigt die mittleren Werte der Wanderungsstrecken der Leukocyten bei den untersuchten Patientengruppen. Bei Normalpersonen lag die Wanderungsstrecke um 1,2 mm in Gegenwart des Eigenserums, während ein Zusatz von Normalserum-Kontroll-Präparation nur eine minimale, nicht signifikante (unspezifische) Hemmung gegenüber der Normalwanderung bewirkte. Die absoluten Wanderungsstrecken für die einzelnen Kollektive varrierten nicht unerheblich nach beiden Richtungen, ohne daß bei der relativen Schwankung der Einzelwerte eindeutige Tendenzen erkennbar wurden.

Die in Abb. 4 aufgeführten entsprechenden Migrationsindices für die Patientengruppen geben verständlicherweise bessere Informationen, kommt es doch nicht auf die absoluten Wanderungsstrecken, sondern auf ihren Vergleich in Gegenwart und Abwesenheit von HBs-Ag-Präparation an, um Rückschlüsse auf eine zelluläre Immunität gegenüber HBs-Ag ziehen zu können.

Bei Normalpersonen betrug die durchschnittliche Wanderung 89 % in Gegenwart von Normalserum-Präparation (Kontroll-Substanz) bezogen auf die Wanderung in Gegenwart des eigenen Serums. In Gegenwart von HBs-Ag-Präparation betrug die Wanderung bezogen auf die Wanderung im Eigenserum 87 % , bezogen auf die Wanderung in Gegenwart von Normalserum-Präparation 96 % . Somit konnte keine spezifische Wanderungshemmung durch HBs-Ag ermittelt werden (s. Abb. 4).

Die Wanderung der Leukocyten von Probanden mit akuter Hepatitis B im Früh-Stadium betrug im Durchschnitt in Anwesenheit von Normalserum-Präparation 78 %, in Anwesenheit von HBs-Ag 73 %, bezogen jeweils auf die Wanderung im Eigenserum; in Anwesenheit von HBs-Ag betrug sie aber 9o %, bezogen auf die Wanderung unter Normalserum-Präparation, so daß auch hier für das Gesamtkollektiv keine signifikante Wanderungshemmung durch HBs-Ag festzustellen war (s. Abb. 4).

Bei den Probanden im Spät-Stadium einer akuten Hepatitis B wurden Wanderungen der Leukozyten von 85 % in Gegenwart von Normal-Präparation, von 8o % in Gegenwart von HBs-Ag-Präparation, bezogen auf die Wanderung im Eigenserum, gefunden; die Wanderung in Gegenwart von HBs-Ag-Präparation betrug 94 %, bezogen auf die unter Normalserum-Präparation ermittelten Werte. Damit ergab sich auch für das Gesamtkollektiv der akuten Hepatitis B im Spätstadium der Erkrankung keine signifikante Migrationshemmung durch HBs-Ag (s. Abb. 4).

Ähnliche Ergebnisse ergaben erwartungsgemäß die Untersuchungen bei der akuten Virus-Hepatitis A (s. Abb. 4).

Bei den Probanden im Früh-Stadium der Erkrankung wurden Migrationsindices von 93 % unter Zusatz von Normalserum-Präparation von 94 % unter Zusatz von HBs-Ag (wiederum bezogen auf die Wanderung unter Zusatz von Eigenserum) und von 1oo % unter Zusatz von HBs-Ag bezogen auf die Wanderung der Zellen unter Zusatz von Normalserum-Präparation ermittelt.

Die entsprechenden Migrationsindices bei den Probanden im Spätstadium der akuten Virushepatitis A lagen bei 88, %, 94 % und 1o5 % .

Stammten die Leukocyten von Probanden, die vor 6 Wochen bis 12 Monaten an akuter Hepatitis erkrankt waren, zur Zeit der Untersuchung jedoch rekonvaleszent und HBs-Ag-negativ waren, und deren Labordaten sämtlich im Normbereich lagen, so betrug der Wanderungsindex im Durchschnitt 8o % mit Normalserum-Präparation-Zusatz, 72 % mit Zusatz von HBs-Ag, bezogen auf die Wanderung im Eigenserum, und 92 % mit Zusatz von HBs-Ag, bezogen auf die Wanderung in Gegenwart von Normalserum-Präparation (s. Abb. 4).

Somit ergab sich für das Gesamtkollektiv der Rekonvaleszenten eine angedeutete, aber nicht signifikante Hemmung der Leukocytenwanderung unter HBs-Ag .

Weiterhin kamen zur Untersuchung Leukocyten von Patienten mit chronisch persistierender HBs-Ag-positiver Hepatitis. Die ermittelten Durchschnittswerte der Wanderung der Leukocyten lagen mit 72 % unter Zusatz von Normalserum-Präparation und mit 66 % unter HBs-Ag Zusatz, bezogen auf die Wanderung im Eigenserum und mit 9o % unter Zusatz von HBs-Ag, bezogen auf die Wanderung unter Normalserum-Prä-

paration-Zusatz, niedriger,als die entsprechenden Werte bei den Untersuchungen von Patienten mit chronisch persistierender HBs-Ag-negativer Hepatitis. Letztere zeigten entsprechende Werte von 93 % und 94 % bzw. 1oo % (s. Abb. 4). Für beide Kollektive war die Wanderungshemmung nicht signifikant. Niedrigere Werte für die Migrationsindices wurden ebenfalls bei den Untersuchten mit chronisch aggressiver HBs-Ag-positiver Hepatitis ermittelt, als bei den Probanden mit chronisch aggressiver HBs-Ag-negativer Hepatitis. Die Wanderung bei den HBs-Ag-positiven Probanden betrug 82 %, 66 % und 81 %, bei den HBs-Ag-negativen lagen die Werte durchschnittlich bei 77 %, 82 % und 1o5 % (s. Abb.4).

Somit ergab sich für das Gesamtkollektiv der HBs-Ag-positiven, chronisch aggressiven Hepatitis, zwar eine deutliche, aber nicht signifikante, für das der HBs-Ag-negativen keine Wanderungshemmung.

Bei Patienten mit HBs-Ag-positiver Leberzirrhose erreichte die Wanderung im Durchschnitt Werte von 73 % in Gegenwart von Normalserum-Präparation und von 69 % in Gegenwart von HBs-Ag-Präparation, wieder bezogen auf die Wanderung in Gegenwart von Eigenserum, und 93% unter HBs-Ag bezogen auf die Wanderung der Leukocyten in Anwesenheit von Normalserum-Präparation. Die entsprechenden Mittelwerte für die Migrationsindices bei Patienten mit HBs-Ag-negativer Leberzirrhose lagen bei 88 % und 93 % bzw. 1o9 % .

Da erst eine Wanderungshemmung von < 75 % als signifikant, d.h. den $\pm$ 2 s Bereich des Mittelwertes der Normalkontrollen überschreitend angesehen wurde und

da die einzelnen Patientengruppen hinsichtlich ihrer lymphocytengebundenen Immunreaktivität gegen HBs-Ag nicht von vornherein in sich einheitlich sein mußten und schließlich unter dem Eindruck, daß HBs-Ag wahrscheinlich ein nur schwaches Antigen in der Sensibilisierung zu zellulärer Immunität ist, wurden die Anteile von Patienten mit signifikanter Migrationsinhibition durch HBs-Ag im Vergleich zu Normalserum-Präparation innerhalb der Einzelgruppen ermittelt (s. Abb. 5). In keinem Falle von gesunden Spendern wurden die Leukocyten durch HBs-Ag in ihrer Wanderung signifikant gehemmt: wir fanden nur eine geringe unspezifische Hemmung in Gegenwart von Normalserum-Präparation in 2 Fällen.

Es konnte erwartungsgemäß auch keine spezifische Wanderungshemmung auf HBs-Ag bei Probanden mit akuter Virushepatitis A im Früh-Stadium sowie im Spät-Stadium der Erkrankung ermittelt werden.

Ähnliche Ergebnisse erhielt man auch bei den Untersuchten mit chronisch persistierender HBs-Ag-negativer Hepatitis und bei Patienten mit chronisch aggressiver HBs-Ag-negativer Hepatitis: Es fanden sich keine spezifischen Hemmungen.

Bei einem von 8 Patienten (12,5 %) im Frühstadium und bei 3 von 14 Patienten (21,4 %) im Spätstadium der Virushepatitis B war die Leukocytenwanderung in Gegenwart von HBs-Ag verglichen mit der Wanderung in Gegenwart der Kontroll-Präparation aus Normalserum signifikant gehemmt.

Bei den Rekonvaleszenten nach einer Virushepatitis B

fand sich sogar bei 5 von 14 Probanden (41,7 %) eine signifikante Erniedrigung des Migrationsindex auf 52 - 7o % .

Die Leukocytenwanderung wurde bei Patienten mit chronisch persistierender HBs-Ag-positiven Hepatitis in nur 1 von 5 Fällen durch HBs-Ag gehemmt (2o %); bei Patienten mit chronisch aggressiver HBs-Ag-positiver Hepatitis wurde eine signifikante Wanderungshemmung bei 4 von 12 Untersuchten beobachtet (33,3 %).

Bei einem von 4 Probanden mit HBs-Ag-positiver Leberzirrhose ergab sich eine signifikante Hemmung der Migration.
Von 7 untersuchten Patienten mit HBs-Ag-negativer Leberzirrhose war einer durch HBs-Ag in der Migration inhibiert (s. Abb. 5).

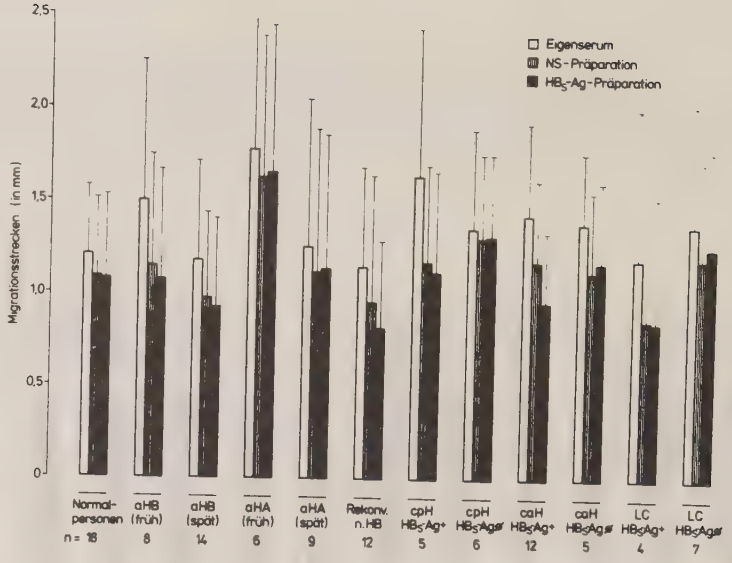

Abb. 3

Wanderungsstrecken der Leukocyten verschiedener Probanden in Gegenwart von Eigenserum, Kontrollpräparation aus Normalserum (NS) und Präparation aus HBs-Ag-haltigem Serum

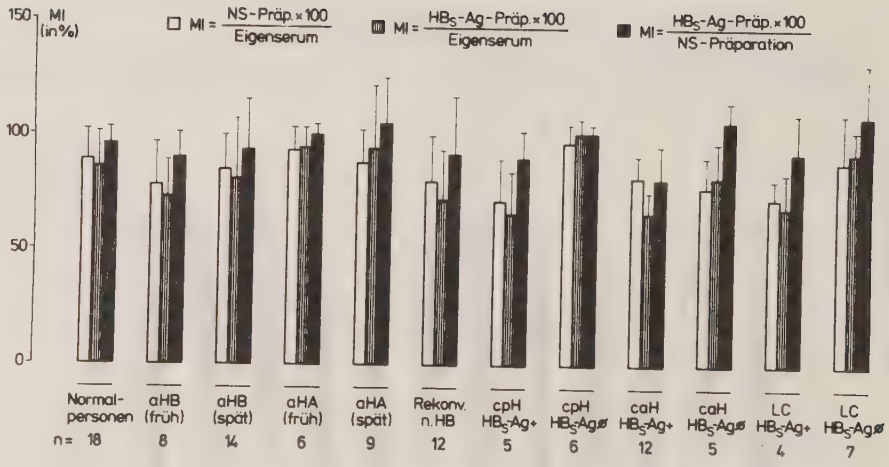

Abb. 4

Migrationsindizes für die Leukocyten verschiedener Probanden in Gegenwart von Eigenserum, Kontrollpräparation aus Normalserum (NS) und Präparation aus HBs-Ag-haltigem Serum

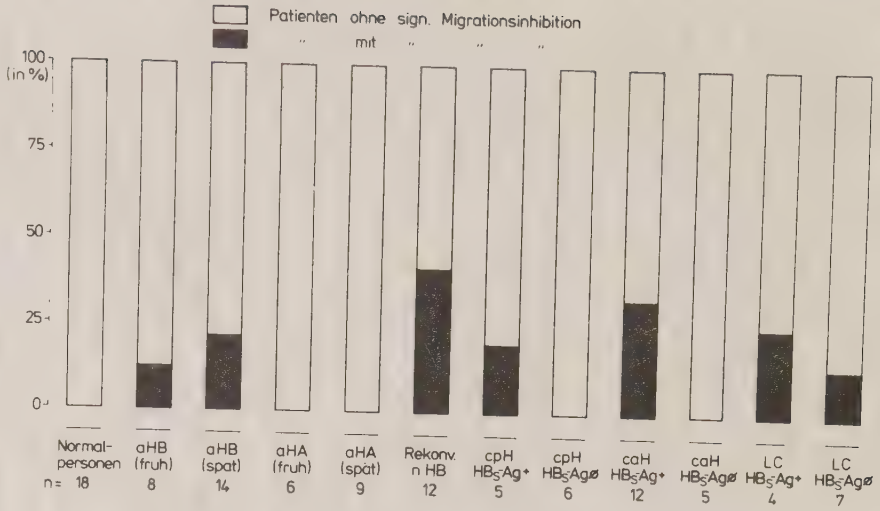

Abb. 5

Anteil von Probanden mit signifikanter Migrationsinhibition der Leukocyten auf HBs-Ag im MI-Test (modifizierte CLAUSEN-Methode)

4. Diskussion

4.1 Diskussion der Theorien der Pathogenese der akuten und chronischen Hepatitis

Die geschichtliche Entwicklung der Pathogenese der Hepatitis wurde am Anfang dieser Arbeit erwähnt. Nach der "Schleimpfropfhypothese" Rudolf Virchows um die Mitte des letzten Jahrhunderts setzte sich in den 3o-er und 4o-er Jahren dieses Jahrhunderts die Virustheorie durch. Es ist jedoch bis heute noch nicht gelungen, den Erreger selbst zu isolieren und weiter zu züchten. Mit der Entdeckung und weitgehenden Identifizierung des Australia-Antigens, das höchstwahrscheinlich virusassoziierte Partikel enthält, wurden neue Hypothesen über die Pathogenese der Hepatitis formuliert: Die Ansicht, daß der Leberzellenuntergang direkte Folge einer alleinigen Virusreduplikation ist, wurde in Frage gestellt. Für die Vielfalt an klinischen Symptomen, die verschiedenen Krankheitsverlaufsformen, die Häufung von HBs-Ag-Persistenz und Chronizität der Hepatitis bei zellulären Immundefekten, wie etwa dem angeborenen im Rahmen des Down'. Syndroms, dem erworbenen bei lymphatischen Systemerkrankungen, Boeck'schem Sarkoidose, Lepra usw., dem toxisch induzierten wie beim chronischen Nierenversagen oder dem therapeutisch durch Glucocorticosteroide, Immunosuppressiva oder Cytostatika hervorgerufenen, sowie bei bestimmter erblicher Disposition (rezessive Vererblichkeit der Fähigkeit, im Falle eines Kontaktes mit dem Virushepatitis B-Virus eine HBs-Ag-Persistenz zu entwickeln) wurden immunologische Vorgänge näher in Betracht gezogen.

Allgemein werden humorale und zelluläre Immunreaktionen unterschieden. Die Bedeutung der humoralen Antikörper und von in Zusammenhang damit entstehenden Immunkomplexen werden für die Pathogenese besonders der chronischen Hepatitis B diskutiert. Einige Autoren (Popper, Dudley, 22, 65) sind der Auffassung, daß diese auf die Chronizität der Hepatitis weitgehend Einfluß haben, Almeida und Shulman (2, 78) wandten sich gegen diese Auffassung, da Immunkomplexe nicht generell beteiligt (67), sondern nur für einige Komplikationen, wie die Panarteriitis nodosa oder Glomerulonephritis verantwortlich seien.

Für die Annahme, daß humorale immunologische Reaktionen möglicherweise nur als Begleitphänomene während der Erkrankung auftreten und ohne wesentliche pathogenetische Bedeutung sind, spricht schließlich auch das Fehlen eines gehäuften Auftretens chronischer Hepatitiden und einer HBs-Ag-Persistenz bei Patienten mit Störungen der humoralen Immunität, also bei solchen mit einer Agammaglobulinaemie vom reinen B-Lymphocyten-Defizienz-Typ.

Diese Beobachtungen ließen die Frage nach allgemeinen oder speziell gegenüber dem Erreger der Virushepatitis B bestehenden T-Lymphocyten-Defizientien besonders dringlich erscheinen.

4.2 Diskussion des Untersuchungsplans

Das allgemeine zelluläre immunologische Reaktionsvermögen wurde mit dem spontanen und vor allem dem Phytohaemagglutinin-stimulierten Desoxyribonukleinsäurestoffwechsel der Lymphocyten von Patienten mit akuter und chronischer Hepatitis überprüft.

Nachdem die Ergebnisse in der Literatur uneinheitlich sind, und keine eindeutige Erklärung der pathogenetischen Zusammenhänge bei Eintritt der Chronizität einer Virushepatitis B ermöglichten, waren Untersuchungen der speziell auf das Antigen der Virushepatitis B gerichteten Reaktionen von Lymphocyten, insbesondere von T-Lymphocyten dringend. Als Antigen bot sich dafür zunächst einmal das HBs-Ag an, das relativ einfach zu gewinnen und anzureichern ist, wenn auch eine Reindarstellung auf Schwierigkeiten stößt und eine völlige Befreiung von alpha-2-Makroglobulin- und Immunglobulin-M-Verunreinigung zumeist zu wesentlichen Substanzverlusten führt, so daß auf eine Reindarstellung zumeist verzichtet werden mußte, und eher die Notwendigkeit paralleler Kontroll-Untersuchungen mit einer Serum-Präparation ohne HBs-Ag, aber mit Spuren von alpha-2-Makroglobulin und IgM in Kauf genommen wurde.

Als Methode boten sich die Lymphocytenkultur mit und ohne HBs-Ag-Präparationszusatz mit anschließender Beobachtung der Stimulation oder fehlenden Stimulation der lymphocytären DNS-Synthese, gemessen anhand der ^{3}H-Thymidin-Einbaurate, als Ausdruck der spezifischen (zellulär-immunologischen) Sensibilisierung der untersuchten Lymphocyten gegen HBs-Ag, sowie der Migrationsinhibitionstest an, der als einer der feinsten Indikatoren für das Vorhandensein einer zellgebundenen Überempfindlichkeit angesehen wird.

Nachdem Untersuchungen mit HBs-Ag in Lymphocytenkulturen nur geringe Stimulationsraten, nämlich von durchschnittlich 2,9-facher Norm, ergeben hatten,und diese Stimulation mit wachsendem Abstand zum Ausbruch

der akuten Hepatitis B bis etwa zum 3. Monat an Häufigkeit zwar zunahm, nie aber mehr als etwa 5o % in einem untersuchten Patientenkollektiv erreichte (bei der chronischen Hepatitis sogar entsprechend weniger), konnte angenommen werden, daß HBs-Ag kein starkes Antigen hinsichtlich der Induktion einer zellulären Immunität ist, daß möglicherweise nicht alle Rekonvaleszenten eine wesentliche Sensibilisierung ihrer T-Lymphocyten gegen das HBs-Ag entwickeln, daß eine solche zellgebundene Immunität bei der chronisch persistierenden Hepatitis oft, bei der chronisch aktiven Hepatitis fast immer fehlt oder sehr schwach ausgeprägt ist oder aber, daß die Lymphocytenkultur als Nachweismethode zellulärer Immunreaktionen gegen HBs-Ag nicht sensibel genug ist. Letzteres würde nicht erstaunen, wenn man die anfänglichen Erfahrungen mit dem Nachweis humoraler Immunantworten auf das HBs-Ag analog zugrundelegt. Waren doch - wider alles Erwarten aus dem Vergleich mit ähnlichen Infektionserkrankungen - meßbare Titer von Antikörpern gegen HBs-Ag zunächst nur äußerst selten zu finden, so selten, daß anti-HBs-Ag-Antikörper oft nicht in ausreichender Menge zur Diagnostik und zur Forschung zur Verfügung standen, konnten sie doch nur von wenigen, offensichtlich besonders "gebusterten" Patienten gewonnen werden, wie Haemophilen, die wiederholt mit Präparationen von Gerinnungsfaktoren aus Plasma behandelt worden waren. (Das Serum, mit dem das HBs-Ag, vormals Australia Antigen, entdeckt und zum ersten Mal präzipitiert worden war, stammte von einem Haemophilen.) Erst durch die Entwicklung sensiblerer Nachweismethoden (Radioimmunoassay) gelang es bei der ganz über-

wiegenden Mehrzahl von Patienten, die eine akute Virushepatitis B durchgemacht hatten anti-HBs-Ag-Antikörper nachzuweisen. So konnte in den Versuch, mit dem sensiblen Migrationsinhibitionstest zum Nachweis zellulärer Immunreaktionen eine T-Lymphocyten-Sensibilisierung gegen HBs-Ag sensibler als bisher mit der Lymphocytenkultur-Methode zu erfassen, einige Hoffnung gesetzt werden, ohne daß verkannt wurde, daß ein solches biologisches Nachweisverfahren nicht die Sensibilität eines Radioimmunassays würde erreichen können.

4.3 Diskussion der verwandten Methoden

Bei der Auswahl des Verfahrens des verwandten Migrationsinhibitionstests mußten Sensibilität, Spezifität, Reproduzierbarkeit und auch Praktikabilität des Tests berücksichtigt werden. Prinzipiell kommen eine getrennte Induktion des Migrationsinhibitionsfaktors und seine Bestimmung in einem zweiten System, dem Indikatorsystem, sowie eine MIF-Testung in einem einfacher durchzuführenden sog. einzeitigen System in Frage. Beim zweizeitigen System werden isolierte Lymphocyten mit dem entsprechenden Antigen kultiviert; sie setzen im Falle einer zellulären Sensibilisierung gegen das Antigen migrationsinhibierenden Faktor - neben anderen als Lymphokine oder Lymphocytenmediatoren bezeichneten biologisch wirksamen Substanzen - in das Kulturmedium frei; die migrationsinhibierende Wirkung kann dann im zweiten Schritt an Indikatorzellen ausgetestet werden: Als Indikatorzellen kommen tierische Zellen, wie Meerschweinchen-Peritonealmakrophagen, in Frage, bei deren Verwendung aber Interpretationsschwierigkeiten der Ergebnisse durch unspezifische Wirkungen in diesem xenogenen System auftreten können, oder aber mensch-

liche Zellen, die diese Schwierigkeiten umgehen helfen, wie zum Beispiel Monocyten oder aber Monocyten-Granulocyten-Gemische, die als ebenso gut verwendbar gefunden wurden (81, 82, 83) und die wesentlich einfacher zu präparieren sind. Das zweizeitige Verfahren ermöglicht weitgehend, unspezifische Wanderungshemmungen auszu schließen, beispielsweise durch eine zwischengeschaltete säulenchromatographische Auftrennung der MIF-haltigen Kulturüberstände in Fraktionen mit unterschiedlichem Molekulargewichtsbereich und Austestung der entsprechenden Fraktion im zweiten System. Andererseits ist die Methode weniger praktikabel und ihre Reproduzierbarkeit bedarf weitaus größerer Übung, da die Zahl der Arbeitsvorgänge viel größer ist, so daß sich für die Praxis oder als Routine-Test ein Verfahren mit sog. einzeitigem MIF-Nachweis eher anbietet. Hier steht nun vor allem die Auswanderung von "buffy coat"-Zellen aus Kapillaren in Medium mit und ohne Antigen auf Glas- oder Plastikflächen nach Søborg und Bendixen (81, 82, 83) zur Verfügung.

Diese Methode wurde mehrmals modifiziert (3, 25, 42) und standardisiert (47).

Mit der Einführung einer neuen Methode durch Clausen (15) und ihre Modifikation von Ax (5), bei der die Wanderung mit Antigen inkubierter oder nicht inkubierter humaner peripherer weißer Blutzellen an der Grenzschicht zwischen einer Plastikunterlage und einem Agar-Gel Überguß gemessen wird, erreichte man ein neues Testverfahren, welches nach parallelen Untersuchungen hinsichtlich Reproduzierbarkeit und Praktikabilität vorzuziehen ist. Ver-

gleichende Untersuchungen haben gezeigt, daß es dem vorgenannten an Sensibilität und Spezifität gleichkommt (17).

Der einzeitige MIF-Test, wie er von Søborg/Bendixen und Clausen/Ax verwendet wurde, läßt eine eindeutige Beurteilung der Befunde nicht ohne weiteres zu, da unspezifische Faktoren (die verwandten Seren konnten eventuell auch andere Substanzen, die auf die Wanderung von Granulocyten/Monocyten Einfluß nehmen konnten, enthalten) nicht ausgeschlossen werden können. Hierbei ist unter anderem an individuelle Unterschiede der Wanderung und des Ausmaßes der primären Stimulation der Lymphocyten in vivo, sowie an durch Zellverfall entstandene Substanzen zu denken: Unspezifische positive Wanderungshemmungen müßten also unter Umständen erwartet werden.

Voruntersuchungen mit Tuberkuloprotein bei tuberkulinpositiven und tuberkulinnegativen Spendern, also am klassischen Beispiel einer zellulären Immunität, waren nötig, bevor der gut reproduzierbare und leicht praktikable Test zum MIF-Nachweis von Clausen/Ax angewandt werden konnte.

Deswegen wurde in den Vorversuchen ein Vergleich zum MIF-Nachweis mit der zweizeitigen Methode (Sodomann, Havemann, Schmidt (87)) durchgeführt.

Diese Voruntersuchungen zeigten, daß

1) die Trennung von MIF-Bildung und -Testung im menschlichen System reproduzierbare Ergebnisse ermöglicht,
2) die MIF-Bildung von der Vorsensibilisierung der

Lymphocyten abhängt und somit bei tuberkulinpositiven, nicht aber bei tuberkulinnegativen Spendern durch Tuberkuloprotein ausgelöst wird,

3) es gleichgültig ist, welche weitgehend lymphocytenfreien Indikatorzellen benutzt werden, solche von tuberkulinpositiven oder -negativen Spendern,
4) die MIF-Wirkung von der Antigenpräsenz unabhängig erscheint,
5) die Wanderungshemmung der Leukocyten tatsächlich auf eine MIF-Wirkung zurückzuführen ist.
6) Ein Vergleich der Immunreaktion im ein- und zweizeitigen MIF-Test mit den entsprechenden Hauttesten zeigte eine gute Übereinstimmung (1o,19).

4.4 Diskussion der Ergebnisse

Somit konnte der zellulären Sensibilisierung gegen HBs-Ag bei Patienten mit akuter und chronischer Hepatitis im Rahmen dieser Arbeit mit dem nach Ax modifizierten Clausen-Test nachgegangen werden.

Wie die beschriebenen Ergebnisse zeigen, erwies sich HBs-Ag als auslösendes Antigen einer zellulären Immunität auch im verwandten Nachweis-System als ein schwaches Antigen, wie das schon von den Untersuchungen über humorale Immunreaktionen gegen HBs-Ag her bekannt ist und wie es sich auch für die zelluläre Immunreaktion auf HBs-Ag mit der Lymphocytenkultur-Technik gezeigt hat. Auch hier mußte festgestellt werden, daß nur etwa die Hälfte der Rekonvaleszenten nach akuter Virushepatitis B eine sicher meßbare T-Lymphocyten-Sensibilisierung zeigte. Allerdings muß darauf hingewiesen werden, daß eine sichere zellgebundene Immunität gegenüber HBs-Ag erst dann

angenommen wurde, wenn die Migrationsindices außerhalb des vierfachen Streubereichs des Mittelwertes des Normalkollektivs ($X \pm 2\ s$) lagen.

Bei der - relativ zu den meisten biochemischen und radio-immunologischen Nachweisverfahren - großen Streubreite der Werte in diesem biologischen Nachweisverfahren wurde diese hohe Signifikanz-Schwellen angenommen, um die resultierenden Aussagen als sicher darstellen zu können, selbst wenn dadurch der Umfang der möglichen Aussage geringer wurde, das heißt also, die hier angegebene Häufigkeit von zellulärer Sensibilisierung gegenüber HBs-Ag möglicherweise unter der tatsächlich bestehenden liegt. Aber in den als positiv angegebenen Fällen läßt sich zumindest zweifelsfrei eine T-Lymphocyten-Immunisation gegen HBs-Ag nachweisen. Die Häufigkeit eines positiven Nachweises zellgebundener Immunität gegen HBs-Ag war in den unterschiedlichen Patientenkollektiven unterschiedlich hoch: Es muß zunächst betont werden, daß bei stets HBs-Ag-negativen Patienten eine Reaktion der T-Lymphocyten gegenüber HBs-Ag nie beobachtet wurde (Normalpersonen, frühe oder späte Phase der akuten Virushepatitis A, HBs-Ag-negative Formen der chronisch persistierenden und chronisch aktiven Hepatitis) mit einer Ausnahme im Kollektiv der Patienten mit alkoholischer Leberzirrhose, in dem einmal eine positive Reaktion angetroffen wurde; in diesem Fall ist zu diskutieren, ob hier nicht - unabhängig vom Alkoholabusus und seinen Folgen - einmal eine Virushepatitis B oder eine Infektion mit dem Virushepatitis B Virus stattgefunden hatte.

Das praktisch völlige Fehlen unerwarteter, dann auch

unerklärbarer und somit "falsch positiver" Reaktionen mit HBs-Ag scheint die Spezifität des verwandten Testsystems zu unterstreichen. Ob allerdings schon eine ausreichende Sensibilität erreicht wurde, muß weiterhin offen bleiben, fanden sich positive MIF-Teste mit HBs-Ag von der akuten Phase der Virushepatitis B bis hin zur Rekonvaleszenz doch nur in Prozentsätzen, die bis knapp 5o anstiegen, und waren die positiven Ergebnisse bei den Patienten mit chronischer HBs-Ag-positiver Hepatitis (allerdings nicht unerwartet) doch noch seltener.

Ausmaß und Häufigkeit der positiven Reaktionen, integriert berechnet, reichten nicht aus, um irgendein Patientenkollektiv insgesamt schon gegenüber dem Normalkollektiv signifikant abzuheben. Wertet man allerdings die Häufigkeit signifikant positiver Ergebnisse in den einzelnen Kollektiven allein, so lassen sich die meisten Gruppen deutlich gegeneinander abheben. Zumindest in all den Fällen, in denen genügend Patienten zur Untersuchung zur Verfügung standen. Die mit dem verwandten MIF-Test ermittelten Ergebnisse stehen in völliger Parallelität zu den mit der Lymphocytenkultur und HBs-Ag erbrachten. Auch das unterstreicht ihre Zuverlässigkeit. Allerdings wird durch das Auffinden sicherer zellulärer Immunreaktionen gegen HBs-Ag mit den beiden Methoden auch klar, daß entweder der MIF-Test die in ihn gesetzte Hoffnung einer größeren Sensibilität im Vergleich zur Lymphocytenkultur-Technik nicht erfüllt, oder aber daß eine T-Lymphocyten-Sensibilisierung tatsächlich nicht bei allen Rekonvaleszenten nach akuter Virushepatitis B vorkommt. Die eingangs dargelegten und zu Beginn der Diskussion noch einmal aufgegriffenen klinischen

Beobachtungen, die die Bedeutung der zellulären Immunreaktionen zur Entstehung und Überwindung der Virushepatitis B deutlich gemacht haben, lassen eher annehmen, daß die Sensibilität der Nachweisverfahren noch nicht ausreicht, um alle Patienten mit tatsächlicher zellgebundener Immunität gegenüber HBs-Ag sicher zu ermitteln. Andererseits machen die Ergebnisse auch deutlich, daß die zellulären Immunreaktionen gegenüber HBs-Ag im allgemeinen viel schwächer sind, als vergleichsweise die, die bei Patienten mit positivem Tuberkulin-Hauttest gegenüber Tuberkulin mit den entsprechenden Methoden gefunden werden, wobei etwa nur ein Viertel bis maximal ein Drittel der Reaktionsstärke erreicht wird, die im Mittel mit Tuberkulin beobachtet wird.

Weitere insbesondere methodische Untersuchungen zu einer Verbesserung der Sensibilität des Nachweisverfahrens der zellulären Immunreaktion gegenüber Hepatitis B-Antigen scheinen demnach erforderlich und sinnvoll zu sein, bevor eindeutige Aussagen über die pathogenetische Bedeutung zellulärer Immunreaktionen gegen HB-Antigen bei der akuten und chronischen Hepatitis B möglich werden als die eingangs zitierten Hypothesen.

Andere Autoren (43) führten ähnliche Untersuchungen mit homologen leberspezifischen Protein (HLP) durch und fanden eine signifikante Migrationshemmung im akuten Stadium der HBs-Ag-positiven Hepatitis. Sie schließen daraus auf eine virusinduzierte Autoimmunreaktion gegen HLP, die jedoch nicht mit Immunreaktionen gegen HBs-Ag gleichzusetzen ist. Bei chronisch aggressiver HBs-Ag-positiver Hepatitis fanden dieselben Autoren (52) eine Wanderungs-

hemmung mit HLP in 85 %, bei kryptogener Leberzirrhose in 42 %. Im Vergleich dazu war bei chronisch persistierender HBs-Ag positiver Hepatitis nur in 11 % und bei Rekonvaleszenten nach Virus-B-Hepatitis in 13 % eine signifikante Wanderungshemmung feststellbar, wobei als Antigen wiederum HLP verwandt wurde.

Ohta und Mitarbeiter (6o) fanden eine Migrationsinhibition gegen Leberzellmembranantigene bei HBs-Ag-positiven Patienten häufiger als bei HBs-Ag-negativen (54 % und 21 %) und ähnliche Ergebnisse auch bei Untersuchungen mit HBs-Ag als Antigen. Sie sind der Meinung (ähnlich wie Sherlock, Edington et al. 24), daß ein Zusammenhang zwischen HBs-Ag-Infektion und Sensibilisierung gegen Leberzellmembranen besteht: durch den Kontakt des Virus mit den Leberzellmembranen werden diese alteriert und können selbst eine zelluläre Immunreaktion induzieren. Diese kann auch nach der Eliminierung des Virus aufrechterhalten bleiben und zur weiteren Leberschädigung führen. Frei (27) führte als erster MIF-Test mit weitgehend gereinigtem HBs-Ag durch und fand im akuten Stadium der Virus-B-Hepatitis sogar eine Stimulation der Wanderung. Er erklärte diese als "schwache Sensibilisierung gegen HBs-Ag" im Anfangsstadium der Erkrankung. Im Spätstadium fand er eine Wanderungshemmung. Diese korrelierte nicht mit dem Auftreten von Antikörpern gegen HBs-Ag. Es fehlten allerdings weitere Patientengruppen, wie z.B. solche mit HBs-Ag-negativer Hepatitis.

Smith und Mitarbeiter (8o) berichteten über eine Wanderungshemmung in 59 % bei Patienten mit chronisch aggressiver Hepatitis und in 4o % der Patienten mit

primär biliärer Cirrhose mit löslichen Lipoproteinen von humaner Leber. Andere Autoren (77) führten diese Untersuchungen mit Leberzellmembranantigenen durch und fanden eine Migrationsinhibition in 42 % bei Patienten mit chronisch aggressiver Hepatitis und in 45 % bei Patienten mit Leberzirrhose. Gleichzeitige Untersuchungen mit Nierenzellmembranantigen bei Patienten mit chronischen Lebererkrankungen, aber ohne Nierenerkrankungen deuteten auf die Spezifität der Migrationsinhibition gegen die Leberzellmembranantigene hin.

Warnatz (95) berichtet über eine Wanderungshemmung von Leukocyten in Anwesenheit von HBs-Ag bei 7 von 11 Patienten mit einer akuten Virus-B-Hepatitis jedoch in keinem Fall bei Patienten mit HBs-Ag-Persistenz nach akuter Virus-B-Hepatitis, dagegen bei 3 von 7 Patienten nach Virus-B-Hepatitis mit anschließendem negativen HBs-Ag-Nachweis, also bei Rekonvaleszenten. Miller und Mitarbeiter (55) berichten über eine Migrationsinhibition in 69 % bei Patienten mit chronisch aggressiver Hepatitis und in 5o % bei Patienten mit primär biliärer Cirrhose.

Unterschiedliche Ergebnisse liegen bei Patienten mit akuter alkohol-induzierter Hepatitis vor. Es wird über eine signifikante Wanderungshemmung durch HBs-Ag (53), die dann schwierig zu erklären wären, sowie aber auch über negative Ergebnisse im MIF-Test, berichtet (39).

Die eigenen Ergebnisse zeigen, wie auch die angefügten Befunde anderer Untersuchungsgruppen auf dem nämlichen Gebiet, daß sich immer mehr Einzel-

beobachtungen anführen lassen, die sich in das angenommene "Gebäude" von Hypothesen einfügen lassen. Diese Befunde sprechen dafür, daß Art und Ausmaß vor allem zellgebundener, d.h. T-Lymphocyten-abhängiger Immunreaktionen gegen HB-Antigen, gegen Virusantigen-Anteile, aber auch gegen alterierte Wirtsproteine eines infizierten Organismus darüber entscheiden, was nach einer Infektion geschieht: ob sich eine akute oder chronische oder keine Erkrankung entwickelt. Allerdings sind diese Befunde noch nicht so lückenlos, daß diese Hypothesen als endgültig bewiesen angesehen werden könnten. Methodische Verbesserungen und genaue Verlaufsbeobachtungen scheinen zunächst am wichtigsten und erfolgversprechendsten zu sein.

5. Zusammenfassung

Es wurden Patienten mit HBs-Antigen-positiver und -negativer akuter, chronisch persistierender, chronisch aggressiver Hepatitis, sowie Rekonvaleszenten nach einer Virus-B-Hepatitis und Patienten mit HBs-Antigen-positiver und -negativer Lebercirrhose, und vergleichsweise gesunde Kontrollpersonen auf ihre zelluläre Immunreaktion gegen HBs-Antigen im einzeitigen Migrationsinhibitionstest (MIF-Test, Clausen/Ax) untersucht. Als Testzellen wurden periphere Leukocyten, als Antigen weitgehend gereinigtes HBs-Antigen verwendet.

Es konnte im Verlauf einer akuten Virus-B-Hepatitis eine Zunahme an spezifisch signifikanten Wanderungshemmungen von Leukocyten durch HBs-Antigen ermittelt werden. War es im Frühstadium nur 1 von 8 Patienten (12,5 %), so reagierten im Spätstadium

3 von 14 Patienten (21,4 %) mit einer spezifischen Wanderungshemmung und bei den Rekonvaleszenten nach einer Virus-B-Hepatitis erreichten 5 von 14 Patienten (41,7 %) einen positiven MIF-Test mit HBs-Antigen.

Bei Patienten mit chronisch persistierender HBs-Antigen positiver Hepatitis war der Anteil mit 1 von 5 Patienten (2o %) niedriger als bei Patienten mit chronisch aggressiver Hepatitis, bei welchen die Leukocytenwanderung bei 4 von 12 Untersuchten (33,3 %) durch HBs-Antigen gehemmt wurde. Bei der HBs-Antigen positiven Lebercirrhose wurde eine signifikante Wanderungshemmung bei 1 von 4 Patienten ermittelt. Von 7 Patienten mit HBs-Antigen negativer Lebercirrhose zeigte 1 Patient eine Migrationsinhibition, wobei hier eine vorausgegangene Virus-B-Hepatitis nicht auszuschließen war.

Erwartungsgemäß konnte keine Wanderungshemmung der Leukocyten durch HBs-Antigen bei gesunden Kontrollpersonen, im Früh- und Spätstadium einer Virus-A-Hepatitis, sowie bei chronisch persistierender und chronisch aggressiver, HBs-Antigen negativer Hepatitis ermittelt werden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß der spezifischen Wanderungshemmung von Leukocyten durch HBs-Antigen eine Sensibilisierung von Lymphocyten im Sinne einer zellgebundenen Immunität gegen HBs-Antigen nach einer Virus-B-Infektion zugrundeliegt, auch wenn dies nicht bei allen Untersuchten festzustellen war. Die Ursache dafür kann einerseits daran liegen,daß HBs-Antigen nur ein schwaches Antigen zur Sensibilisierung im Sinne einer zellulären Immunreaktion ist oder aber daß die verwandte Methode nicht empfindlich genug ist,

diese sicher zu erfassen. Die Frage nach dem pathogenetischen Zusammenhang zwischen der zellulären Immunreaktion gegen HBs-Antigen und der Entstehung und dem weiteren Verlauf der Virushepatitis läßt sich noch nicht endgültig beantworten, ihr muß durch weitere in Vitro-Untersuchungen und klinischen Beobachtungen nachgegangen werden.

6. Literatur

1. ALMEIDA, J.D., ZUCKERMAN, A.J., TAYLOR, E.P., WATERSON, A.P.:
Immun Electron Microscopy of the Au (SH) Ag.
Microbiol. 2 , 117 (1969)

2. ALMEIDA, J.D., WATERSON, A.P.:
Immun Complexes in Hepatitis.
Lancet 1969 ii, p. 983

3. ALZER, G., SCHUMACHER, K., HIRSCHMAN , W.D., OERKERMAN, H.:
The problem of reproducibility of migration inhibition of peripheral leukocytes in cases of tuberculin allergy.
Z. Immun. Forsch. 141, 181 (1971)

4. ASTOR, S., SPITLER, L.E., FRICK, O.L., FUDENBERG, H.H.:
Human leukocyte migration inhibition in agarose using four antigens: correlation with skin reactivity.
J. Immunol. 11o, 1174 (1973)

5. AX, W., TAUTZ, CH.:
Assay of Leukocyte Migration Inhibition under Agarose.
Behring Inst. Mitt. 54, 71 (1974)

6. BARBER, H., OSBORN, G.R.:
The Morbid Anatomy of a Sporadic Case of Infective Hepatic Jaundice.
J. Path. Bact. 49, 581 (1939)

7. BARKER, L.E., PETERSON, M.R., MURRAY, R.:
Application of the Microtiter Complement Fixation Technique to Studies of the Hepatitis Associated Antigen in Human Hepatitis.
Vox. sang. 19, 211 (197o)

8. BAYER, M.E., BLUMBERG, B.S., WERNER, B.:
Particles associated with Australia Antigen in the sera of patients with leukemia, Down's syndrom and Hepatitis.
Nature (Lond.) 218, 1o57 (1968)

9. BENDIXEN, G., SØBORG, M.:
A leukocyte migration technique for in vitro detection of cellular (delayed type) hypersensitivity in man.
Dan. med. Bull. 16, 1 (1969)

1o. BLOOM, B.R., BENNET, B.:
Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed type hypersensitivity.
Science 153, 8o (1966)

11. BLUMBERG, B.S., ALTER, H.J., VISNICH, S.:
A new antigen in leukemia sera.
J.A.M.A. 191, 541 (1965)

12. BONACKER, L., STÄRK, J.:
Latex-Agglutination, eine schnelle Screeningmethode zum Nachweis der "Hepatitis Associated Antigen".
Klin. Wschr. 5o , 166 (1972)

13. BOUVIER, G.L., Le:
The Heterogenity of Australia Antigen.
J. Infect. Dis. 123, 6 (1971)

14. CLAUSEN, J.E., SØBORG, M.:
In vitro detection of tuberkulin hypersensitivity in man.
Acta Scand. Med. 186, 227 (1969)

15. CLAUSEN, J.E.:
Tuberculin induced migration inhibition of human peripheral leukocytes in agarose medium.
Acta Allerg. 26, 56 (1971)

16. CLAUSEN, J.E.:
Migration inhibitory effect of cell free supernatants from mixed human lymphocytes cultures.
J. Immunol. 1o8, 453 (1972)

17. CLAUSEN, J.E.:
Comparison between capillary tube and agarose migration technique in the study of human peripheral blood leukocytes.
Acta Allergol. 28, 145 (1973)

18. DANE, D.S., CAMERON, C.H., BRIGES, M.:
Virus-like Particles in Serum of Patients with AuAg positive Hepatitis.
Lancet 197o i, p. 625

19. DAVID, J.R., AL-ASKARI, R., LAWRENCE, H.S., THOMAS, L.:
Delayed hypersensitivity in vitro. I. The specifity of inhibition of cell migration by antigens.
J. Immunol. 93, 264 (1964)

2o. DE GROTE, J., GEDIGK, P., POPPER, H., SCHEURER, P.J., THALER, H., DESMET, V.J., KORB, G., POULSEN, H., SCHMID, M., UEHLINGER, E., WEPLER, W.: A classification of chronic hepatis Lancet 1968 ii, p. 627

21. DIENSTAG, J.L., FEINSTONE, S.M., KAPIKIAN, A.L., PURCELL, R.H., BOGGS, J.D., CONRAD, M.E.: Faecal shedding of hepatitis-A Antigen. Lancet 1975 i 5 p. 765

22. DUDLEY, F.J., FOX, R.A., SHERLOCK, S.: Cellular Immunity and Hepatitis-Associated (Australia) Antigen in Liver Disease. Lancet 1972 i, p. 723

23. DUDLEY, F. J., GIUSTINO, V., SHERLOCK, S.: Cell-mediated immunity in patients positive for hepatitis-associated antigen. Brit. Med. J. 4, 754 (1972)

24. EDDINGTON, T. S., CHISARI, F.U.: Immunological Aspects of Hepatitis B-Virus Infection. Amer. J. Med. Sci. 27o, 213 (1975)

25. FEDERLIN, K., MAINI, R.N., RUSSELL, A.S., DUMONDE, D.C.: A micro-method for peripheral leukocyte migration in tuberculin sensitivity. J. Clin. Pathol. 24, 553 (1971)

26. FEINSTONE, S.M., KAPIKIAN, A.L., PURCELL, R.H.: Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness. Science 182, 1o26 (1973)

27. FREI, P.C., ERARD, P.H., ZINKERNAGEL, R.: Cell-mediated immunity to hepatitis - associated antigen (HAA) demonstrated by leukocyte migration test during and after acute B- hepatitis. Biomed. 19, 379 (1973)

28. GASKELL, J.F.: The Changes in the Liver in a Fatal Case of "Catarrhal" Jaundice. J. Pathol. Bact. 36, 257 (1933)

29. GEORGE, M., VAUGHAN, J.H.: In vitro cell migration as a modell for delayed hypersensitivity. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 3, 514 (1962)

3o. GERETY, J.R., HOOFNAGLE, J.H., BARBER, L.F.: Humoral and cell-mediated immune responses to two hepatitis B-virus antigen in guinea pigs. J. Immunol. 113, 1223 (1974)

31. GLADE, P.R., DOUGLAS, S.D., HIRSHAUT, Y., HIRSCHHORN, K.:
Lymphoid Suspension Cultures from Patients with Viral Hepatitis.
Lancet 1968 ii, p. 1273

32. HAVEMANN, K.:
Nucleinsäure- und Proteinstoffwechsel in Lymphocytenkulturen von Gesunden und Patienten mit Erkrankungen des lymphatischen Systems. I. Methodik und kinetische Untersuchung bei Gesunden.
Z. ges. exp. Med. 151, 138 (1969)

33. HAVENS, W.P. jr.:
Properties of the etiologic agent of infectious hepatitis.
Proc. Soc. Exp. Biol. 58, 2o3 (1945)

34. HAVENS, W.P. jr.:
Period of infectivity of patients with experimentally induced infectious hepatitis.
J. Exp. Med. 83, 251, (1946)

35. HARRINGTON, J.T. jr., STASTNY, P.:
Macrophage migration from an agarose droplet: Development of a micromethod for assay of delayed hypersensitivity.
J. Immunol. 11o, 752 (1973)

36. HARRINGTON, J.T. jr.:
Macrophage migration from an agarose droplet: A mircomethod for assay of delayed hypersensitivity in the mouse.
Cell. Immunol. 12, 476 (1974)

37. HOLMES, A.W., DEINHARDT, F., WOLFE, L.:
Specific neutralization of human hepatitis type A in marmorset monkeys.
Nature 243, 419 (1973)

38. HOLLÓS, I., PALFI, A., BARANYAI, E., NOVÂK, E.:
Immune-idian ink method for detection of hepatitis A associated antigen and antibody.
Acta microbiol. Acad. Sci. hung. 22 , 169 (1975)

39. HOWLET, S.A., MC GUIGAN, J.E.:
Inhibition of macrophage migration in response to hepatitis B - antigen.
Gastroenterol. 69, 96o (1975)

4o. IRWIN, G.R., HIERHOLZER, W. jr., CIMIS, R., MC COLLUM, R.W.:
Delayed hypersensitivity in hepatitis B ; clinical correlates of in vitro production of migration inhibition factor.
J. Infect. Dis. 13o, 58o (1974)

41. JOZWIAK, W,. KOSCIELAK, J., MADALINSKI, K., BRZOSKO, W.J., NOVOSLAVSKI, A., KLOCZEWI, A.K.M.:
RNA of Australia - Antigen
Nature N. Biol. 229, 92 (1971)

42. KALTREIDER, H.B., SOGHOR, D., TAYLOR, J.B., DECKER, J.L.:
Capillary tube migration for detection of human delayed hypersensitivity: difficulties encountered with "buffy coat" cells and tuberculin antigen.
J. Immunol. 1o3, 179 (1969)

43. KNOLLE, J., MEYER zum BÜSCHENFELDE, K.H., BOLTE, J.P., BERGER, J.:
Celluläre Immunreaktion gegenüber dem HAA und homologen leberspezifischen Protein (HLP) bei akuten HAA - positiven Hepatitiden.
Klin. Wschr. 51, 1172 (1973)

44. KRUGMANN, S. WARD, R., GILES, J.P., BODANSKY, O., JACOBS, A.M.:
Infectious Hepatitis Detection of Virus during the Incubation Period and in Clinically Inapperent Infection.
New Engl. J. Med. 261, 729 (1959)

45. MAC CALLUM, F.O.:
Early studies of viral hepatitis.
Brit. Med. Bull. 28, 1o5 (1972)

46. MAGNIUS, L.O., EPSMARK, A.:
A new antigen complex co-occuring with australia-antigen.
Acta Path. Microbiol. Scand., Section B, 8o, 335 (1972)

47. MAINI, R.N., ROFFE, L.M., MAGRATH, I.T., DUMONDE, D.C.:
Standardization of the Leukocyte Migration Test.
Int. Arch. Allergy 45, 3o8 (1973)

48. MALCHOW, H., SODOMANN, C.-P.:
Die klinische Bedeutung von in vitro-Methoden zum Nachweis einer cellulären Immunität.
Internist 13, 66 (1972)

49. MARTINI, G.A., SODOMANN, C.-P.:
Cellular Immune Reactions in Chronic Hepatitis.
Int. Symp. Montecatini 1975, p. 1oo

5o. MAYNARD, J.E., BRADLEY, D.W., GRAVELLE, C.R., HORNBECK, C.L., COOK, E.H.:
Virus-like particles in hepatitis A
Lancet 1974 ii p. 789o

51. MC CLAMON, R.T., PINCKARD, R.N., OLSON, M.S.:
Production of macrophage inhibition factor by rat lymphocytes following exposure to isologous liver subcellular membranes.
Clin. Immunol. Immunopathol. 3, 541 (1975)

52. MEYER zum BÜSCHENFELDE, K.H., KNOLLE, J., BERGER, J.:
Celluläre Immunreaktionen gegenüber HLP bei chronischen Leberentzündungen.
Klin. Wschr. 52, 246 (1974)

53. MIHAS, A.A., BULL, D.M., DAVIDSON, C.S.:
Cell-mediated immunity to liver in patients with alkoholic hepatitis.
Lancet 1975 i, p. 951

54. MILLER, W.J., PROVOST, J., MC ALLER, W.J.:
Specific immune adherence assay for human hepatitis A antibody application to diagnostic and epidemiologic investigations.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 149, 254 (1975)

55. MILLER, J., MITCHELL, C.G., EDDLESTON, A.L.W.F., SMITH, M.G., REED, W.D., WILLIAMS, R.:
Cell - mediated immunity to a human liver - specific antigen in patients with active chronic hepatitis and primary biliary cirrhosis.
Lancet 1972 ii, p. 296

56. MILLMAN, I., LOEB, L.A., BAYER, M.E., BLUMBERG, B.S.:
Australia Antigen (a hepatitis associated Antigen) Purification and physical properties.
J. Exp. Med. 131, 119o (197o)

57. MILLMAN, I., AGARWAL, S.S., BUGBEE, S.J., BLUMBERG, B.S., LOEB, L.A.:
Lymphocyte Transformation and Hepatitis: II. Lack of Direct in vitro Inhibition by Purified Australia Antigen.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 138, 198 (1971)

58. MORGAN, M.T., BROWN, H.C.:
Epidemic Catarrhal Jaundice.
Ministry of Health's Report on Publ. Health and Med. Subj. No. 42 (1927)

59. NEEL, J.R., GELLIS, S.S., STOKES, I. jr.:
Homologous serum hepatitis and infectious (epidemic) hepatitis: studies in volunteers bearing on immunological and other characteristics of the etiological agents.
Amer. J. Med. 1, 3 (1946)

6o. OHTO, G., NONOMURA, A., NISHIMURA, I.:
Leukocyte migration inhibition with inner and outer membranes of mitochondria and isoluble hepatocyte surface membranes prepared from rat liver in patients with chronic hepatitis and cirrhosis.
Clin. Exp. Immunol. 26, 491 (1976)

61. OKOCHI, K. MURAKAMI, S.:
Observation on Australia Antigen in Japenese.
Vox Sang. 15, 374 (1968)

62. NIELSON, J.O., DIETRICHSON, O., JUHL, E.:
Incidence and meaning of "e" determinant among hepatitis-B-antigen positive patients with acute and chronic liver diseases.
Lancet 1974 ii, p. 913

63. PERLMANN, P., HOLM, G.:
Cytotoxie effects of lymphoid cells in vitro.
Advanc. Immunol. 11, 117 (1969)

64. PESENDORFER, F., KRASSNITZKY, O., WEWALKA, F.:
Immunelektrophoretischer Nachweis von "Hepatitis-Associated Antigen" (Au/SH-Antigen).
Klin. Wschr. 48, 58 (197o)

65. POPPER, H., MACKAY, R.I.:
Relation between Australia-Antigen and Autoimmune Hepatitis.
Lancet 1972 i , p. 1161

66. PRINCE, A.M.:
An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis.
Proc. Nat. Acad. Science 6o, 814 (1968)

67. PRINCE, A.M., TREPO, C.:
HBs-Antigen and Antibodies in Chronic Course of Hepatitis.
Tagung der Ges. f. Immunologie, Hannover 1974
(Abstrakt gedruckt)

68. RICH, A.R., LEWIS, M.R.
Mechanism of allergy in tuberculosis.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 25, 596 (1928)

69. RÖSSLER, R., HAVEMANN, K.:
Zur Pathogenese der chron. Hepatitis.
Dtsch. Med. Wschr. 95, 1 (197o)

7o. ROTHER, M.:
Untersuchungen über zellgebundene Immunreaktionen bei der akuten und chronischen Hepatitis.
Dissertation, Universität Marburg, 1976

71. SALVIN, S.B., NISHIO, I.:
In vitro cell reactions in delayed hypersensitivity.
J. Immunol. 103, 138 (1969)

72. SCHOBER, A., KABOTH, U., THOMSSEN, R.:
Physikalische Eigenschaften des Australia-SH-Antigens.
Arch. ges. Virusforsch. 33, 364 (1971)

73. SCHOBER, A.R., SUNDMACHER, R., THOMSSEN, O., DREES, J.:
Sedimentations Constant of Hepatitis - associated Antigen.
Arch. ges. Virusforsch. 35, 314 (1971)

74. SCHOBER, A., THOMSSEN, R.:
Nature and demonstration of hepatitis B-(australia) antigen and its antibody.
Internist 14, 546 (1973)

75. SCHUMACHER, K., MAERKE-ALZER, G.:
Verhalten und Bedeutung der Immunglobuline bei der akuten und chronischen Hepatitis.
Internist 14, 578 (1973)

76. SCHUMACHER, K., MARKE-ALZER, G.:
Lit. n. 1971

77. SHEFFIELD, T.B., EMMELOT, P.:
Studies on plasma membranes XVI. Tissue specific antigens in the liver cell surface.
Exp. Cell. Res. 71, 97 (1972)

78. SHULMAN, N.R.:
Hepatitis associated Antigen.
Amer. J. Med. 49, 669 (1970)

79. SENYK, G., HADLEY, W.K.:
In Vitro Correlates of Delayed Hypersensitivity in Man: Ambiguity of Polymorphonuclear Neutrophils as Indicator Cells in Leukocyte Migration Test.
Infect. Immun. 8, 370 (1973)

80. SMITH, M.G.M., EDDLESTON, A.L.W.F., WILLIAMS, R.:
Immunological factor in the evolution of active chronic hepatitis and other autoimmune liver diseases.
Clin. Gastroenterol. 4, 297 (1975)

81. SØBORG, M., BENDIXEN, G.:
Human Lymphocytes migration as a parameter of hypersensitivity.
Acta Med. Scand. 181, 247 (1967)

82. SØBORG, M.:
In vitro detection of cellular hypersensitivity in man.
Acta Med. Scand. 182, 167 (1967)

83. SØBORG, M.:
In vitro migration of peripheral human leukocytes in cellular hypersensitivity.
Acta Med. Scand. 184, 135 (1968)

84. SODOMANN, C.-P., HAVEMANN, K.:
Die Bedeutung zellulärer Immunreaktionen bei der Hepatitis.
Internist 14, 583 (1973)

85. SODOMANN, C.-P., ROTHER, M., HAVEMANN, K., SCHMIDT, H.:
PHA - Stimulierbarkeit von Lymphocyten bei HB-Ag positiver und negativer Hepatitis.
Arbeitstagung über Leukocyten-Kulturen, Innsbruck 1973
(Abstrakt gedruckt)

86. SODOMANN, C.-P., LOH, S. von:
Die Subtypen des Australia-Antigens und ihre Bedeutung.
Internist 14, 531 (1973)

87. SODOMANN, C.-P., SCHMIDT, M., HAVEMANN, K.:
In vitro Untersuchungen über den Einfluß des Migrations-Inhibitions-Faktors (MIF) von Lymphocyten auf periphere Blutmonocyten und Granulocyten beim Menschen.
Verh. Dsch. Ges. innere Med. 77, (1971)

88. SODOMANN, C.-P.:
Klinik und Immunphaenomene bei der Hepatitis.
Medica 1976, Düsseldorf

89. SODOMANN, C.-P.:
Technik und Signifikanz immunologischer Methoden in der Leberdiagnostik.
21. ärztliche Fortbildung, Bad Kissingen 1975

90. SODOMANN, C.-P., HAVEMANN, K., MARTINI, G.A.:
Cellular Immune Reactions in the Course of Virus Hepatitis.
European Association for the Study of the Liver.

91. THULTRUP, H., DYBKYAER, E.:
Screening for Hepatitis Associated Antigen by Three Different Methods.
Vox Sang. 19, 234 (1970)

92. VILLAREJOS, V.M., KIRSTEN, P.H.:
Evidence for viral hepatitis other than type A or type B among Persons in Costa Rica.
New Engl. J. Med. 293, 135o (1975)

93. VIRCHOW, R.:
Über das Vorkommen und den Nachweis des hepatogenen, inbesondere des katarrhalischen Ikterus.
Virchows Arch. path. Anat. Physiol. 32, 117 (1865)

94. WALSH, J.H., YALOW, R.S., BERSON, S.A.:
Radioimmunoassay of Australia Antigen.
Vox Sang 19, 217 (197o)

95. WARNATZ, H.:
Immune reactions to hepatitis B-antigen in acute and chronic hepatitis.
Acta Hepatogastroenterol. 21, 237 (1974)

96. WEISBART, R.H., CUNNINGHAM, J.E., BLUESTONE, R., GOLBERG, L.S.:
A modified agarose method for detection of migration inhibitory factor and delineation of its antigen dependency.
Int. Arch. Allerg. Appl. Immunol. 45, 612 (1973)

Herrn Prof. C.-P. Sodomann danke ich für seine allzeit freundliche Unterstützung bei der Einweisung in die Methodik und seine Hilfe bei der Abfassung des Textes.

Weiterhin danke ich Frau Schmidt sowie allen anderen medizinisch-technischen Assistentinnen des Labors für die Unterstützung bei der Durchführung der Versuche.

L e b e n s l a u f

Am 1o. 7. 1951 wurde ich , Magdalena Pencev, als erstes Kind des Dr. med. Jordan Pencev und seiner Ehefrau Miloslava geb. Krystufkova in Prag geboren.

Ab 1957 besuchte ich die Neunjährige Grundschule in Varnsdorf /Tschechoslowakei und wechselte 1966 auf die Mittlere Allgemeinbildende Schule in Tanvald/Tsch., wo ich 1969 das Abitur bestand.

Im Wintersemester 1969/7o begann ich an der Karls-Universität in Prag Humanmedizin zu studieren. Nach der Übersiedlung in die Bundesrepublik Deutschland im Januar 197o besuchte ich das Studienkolleg für ausländische Studierende in Frankfurt a. M. und beendete dies im September 197o mit Abschlußprüfung.

Im Wintersemester 197o/71 begann ich in Marburg a.d.L. das Medizinstudium, bestand nach zwei Semestern das Vorphysikum und legte nach weiteren drei Semestern das Physikum ab. Ab Wintersemester 1973/74 setzte ich das Studium zwei Semester an der Universität Wien fort und kehrte im Wintersemester 1974/75 nach Marburg zurück. Im August 1976 habe ich das Studium mit dem Staatsexamen abgeschlossen. Von Dezember 1976 bis Juni 1977 war ich als Medizinalassistentin in der Med. Universitäts-Poliklinik in Marburg a.d.L. tätig.

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren Professoren und Dozenten

in Marburg:
Amon, Arndt, Aurich, Aziz, Baltzer, Bode, Buchholz, Busch, Büsing, Castenholz, Daume, Dehnicke, Deppe, Dimroth, Dittrich, Dombrowski, Doss, Egbring, Eißner, Eschenbach, Frank, Gerdes, Gössel, Graul, Haberich, Hamelmann, Hamm, Hardewig, Havemann, Hensel, Heß, Hildebrandt, Hilgermann, Hort, Jacob, Kaffarnik, Karl, Karlson, Klein, Knauff, Knoecke, Köhler, Koransky, Lange, Lauer, Martini, Maroske, Oepen, Petry, Pots, Richter, Riecken, Rodeck, Rohen, Schmid, Schmitz-Moormann, Schneider, Sekeris, Siegrist, Thoenes, Walcher, Wehmeyer, Wiegandt.

in Wien:
Berner, Burian, Chiari, Deutsch, Flaume, Holzner, Kempny, Navratil, Novotny, Obiditsch-Mayer, Palmrich, Reisner, Siedek, Slezak, Speiser, Thalhammer

in Prag:
Frankenberger, Karásek, Lemež, Richter, Sekla, Sula, Trávnicèk, Wolf